

Aus der Klinik für Innere Medizin III (Kardiologie, Angiologie und  
Internistische Intensivmedizin),  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm

**Charakterisierung einer CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+  
Subpopulation von endothelialen Progenitorzellen mit hohem  
vasoregenerativem Potential**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2007

Vorgelegt von: John Benjamin Scharlau  
geb. am 02.09.1979 in Hamburg

“O Captain! my captain!  
our fearful trip is done ...”

Walt Whitman (1819–1892)

Meinem Vater gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Zusammenfassung .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Einleitung .....</b>	<b>12</b>
3.1. Definition der Atherosklerose .....	12
3.2. Epidemiologie der Atherosklerose .....	12
3.3. Ätiologie der Atherosklerose .....	13
3.4. Pathophysiologie der Atherosklerose .....	14
3.4.1. Auslöser der Atherosklerose .....	14
3.4.2. Die frühe Entwicklung eines atherosklerotischen Plaques .....	16
3.4.3. Die Entwicklung zu großen atherosklerotischen Plaques .....	16
3.4.4. Die Plaqueruptur .....	17
3.4.5. Heutige Therapiemöglichkeiten .....	19
3.5. Neue Therapiemöglichkeiten .....	19
3.6. Fragestellung dieser Arbeit .....	21
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
4.1. Material .....	23
4.1.1. Verwendete Substanzen .....	23
4.1.2. Puffer .....	24
4.1.3. Antikörper .....	25
4.1.4. Geräte und Materialien .....	27
4.1.5. Versuchstiere .....	27
4.2. Methoden .....	28
4.2.1. Isolation zirkulierender humaner EPC Subpopulationen .....	28
4.2.2. Kultur humaner EPC Subpopulationen .....	30
4.2.3. Humane koronare Atherektomien .....	31
4.2.4. Humanes Ischämiemodell .....	32

4.2.5.	Xenotransplantationsmodell .....	33
4.2.6.	Carotis-Injury-Modell .....	34
4.2.7.	Angiogenesediskusmodell .....	35
4.2.8.	Fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse .....	36
4.2.8.1.	Grundprinzip der fluoreszenzaktivierten Zellsortieranalyse .....	36
4.2.8.2.	Reinheitsbestimmung mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortieranalyse .....	36
4.2.8.3.	Fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse von EPC Subpopulationen in Kultur .....	38
4.2.8.4.	Fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse von EPC Subpopulationen nach Ischämie .....	39
4.2.9.	Immunhistochemie .....	39
4.2.9.1.	Grundprinzip der Immunhistochemie .....	39
4.2.9.2.	Immunhistochemie humaner EPC Subpopulationen in Kultur .....	40
4.2.9.3.	Immunhistochemie humaner koronarer Atherektomien .....	41
4.2.9.4.	Immunhistochemie entnommener Nacktmauscarotiden .....	42
4.2.9.5.	Fluoreszenzmikroskopie .....	43
4.2.9.5.1.	Fluoreszenzmikroskopie humaner EPC Subpopulationen in Kultur .....	43
4.2.9.5.2.	Fluoreszenzmikroskopie humaner koronarer Atherektomien .....	44
4.2.9.5.3.	Fluoreszenzmikroskopie entnommener Nacktmauscarotiden .....	44
4.2.10.	Statische Adhäsionsversuche .....	45
4.3.	Statistik .....	46
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
5.1.	CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC sind Vorläufer von CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC .....	47
5.2.	CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC werden bei Ischämie hochreguliert .....	55

5.3.	CD 34- / CD 133+ EPC werden in stabilen koronaren Läsionen exprimiert und in instabilen koronaren Läsionen hochreguliert .....	60
5.4.	Transplantierte CD 34- / CD 133+ EPC fördern die Reendothelialisierung und vermindern die Größe vaskulärer Läsionen .....	64
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
6.1.	CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC sind eine dritte EPC Subpopulation und Vorläufer von CD 133+ / CD 34+ / VEGFR-2+ EPC .....	78
6.2.	CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC werden vermehrt an Orten von Ischämie rekrutiert weisen eine höhere SDF-1 $\alpha$ vermittelte Adhäsion auf .....	80
6.3.	CD 34- / CD 133+ EPC werden in instabilen koronaren Läsionen höher exprimiert als in stabilen koronaren Läsionen .....	83
6.4.	Transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC fördern die Reendothelialisierung sowie die Neoangiogenese und vermindern die Größe vaskulärer Läsionen .....	86
6.5.	Fazit dieser Arbeit .....	92
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>8.</b>	<b>Dank .....</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>Vorabveröffentlichungen .....</b>	<b>102</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>103</b>

## 1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
APC	Allophycocyanin
Aqua. Dest.	Deionisiertes und bidestilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
ca.	Circa
CD	Cluster of differentiation
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4
CXCL12	CXC-Chemokinligand 12
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
Dil-Ac-LDL	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tatramethylindocarbocyanin markiertes azetyliertes low-density Lipoprotein
EBM	Endothelzellmedium
EC	Endothelzellen
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
et al.	Et alii (und andere)
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum

Flk-1	Fetale Leberkinase 1 (Humanes Homolog von VEGFR-2 in Mäusen)
Flk-2	Fetale Leberkinase 2
Flt-3	FMS ähnliche Tyrosinkinase 3
FMS	Fenpropimorph resistance multicopy suppressor
GA	Gentamicin
G-CSF	Granulozyten Kolonie Stimulationsfaktor
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
d, h, min, s	Tag, Stunde, Minute, Sekunde
<i>h</i>	Human
HDL	High density Lipoprotein
hEGF	Humaner endothelialer Wachstumsfaktor
hpf	Hochauflösendes Gesichtsfeld
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
KDR	Kinase insert domain receptor (Humanes Homolog von VEGFR-2 in Mäusen)
KG	Körpergewicht
konz.	Konzentriert
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LDL	Low density Lipoprotein
LS	Zylindergrößenbezeichnung für maximal $1 \times 10^8$ Zellen
m	Männlich

mmHG	Millimeter Quecksilberblutdrucksäule
MS	Zylindergrößenbezeichnung für maximal $1 \times 10^7$ Zellen
MCP-1	Monozytenchemotaktisches Protein 1
M-CSF	Makrophagen Kolonie Stimulationsfaktor
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
nM	Nanomolar
NO	Stickoxid
OCT	Optimale Schnittemperatur
p	p-Wert
Pab	Polyklonale Antikörper
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBSF	Prä B-Zell Wachstumsstimulationsfaktor
PECAM-1	Endotheliales Plättchenzelladhäsionsmolekül 1
PERCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein
PKH	Paul Karl Horan Farbstoff (Name des Entdeckers)
Rh SDF-1 $\alpha$	Rekombinanter humaner Stromazellwachstumsfaktor 1 $\alpha$
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Abk. für Roswell Park Memorial Institute Medium
SAV	Streptavidin
SDF-1 $\alpha$	Stromazellwachstumsfaktor 1 $\alpha$
Tween	Polyoxyethylensorbitant
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VEGFR-2	Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktorrezeptor 2
vs.	Versus



VLDL	Very low density Lipoprotein
w	Weiblich
z.B.	Zum Beispiel
μm	Mikrometer
°	Winkelgrad

## 2. Zusammenfassung

**Einleitung:** Die Atherosklerose gehört zu den Hauptverursachern von koronaren Herzerkrankungen und Schlaganfällen in der westlichen Welt. Die vaskuläre Regeneration sowie die Neovaskulogenese spielen eine wichtige Rolle bezüglich möglicher Prävention und Heilung dieser Volkskrankheit. Das vorherrschende Dogma, dass im adulten Organismus die Entwicklung neuer Blutgefäße nur über Migration und Proliferation, ausgehend von benachbarten reifen Endothelzellen möglich sei, wurde in den letzten Jahren durch die Entdeckung endothelialer Progenitorzellen verworfen. Diese unreifen zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen besitzen unter anderem die Fähigkeit, sich in reife Endothelzellen zu differenzieren. Es konnte gezeigt werden, dass endotheliale Progenitorzellen bei Gewebischämie oder bei Störung der Integrität der endothelialen Zellschicht aus dem Knochenmark in die Zirkulation mobilisiert werden. Von dort aus werden sie in geschädigte Gewebe rekrutiert und fördern dort die Neovaskulogenese, was zu einer verbesserten Durchblutung und zur Gewebsregeneration führt.

**Methoden:** Aus peripherem humanen Blut wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und magnetischen Beads CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ und CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endotheliale Progenitorzellen isoliert. Beide Subpopulationen wurden *in vitro* unter endothelspezifischen Bedingungen kultiviert und mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortieranalyse sowie immunzytometrisch auf das quantitative Potential sich in reife Endothelzellen differenzieren zu können, untersucht. Anhand des in dieser Arbeit beschriebenen humanen Ischämiemodells wurde *in vivo* die Verteilung der CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ und CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelialen Progenitorzellen innerhalb eines ischämischen Bezirkes bestimmt. In diesem Zusammenhang wurde *in vitro* auch die Adhäsion der beiden endothelialen Progenitorzellsubpopulationen unter dem Einfluss von SDF-1a verglichen. Zusätzlich wurden *in vivo* humane stabile und instabile koronare Läsionen sowie In-Stent-Restenosen auf das Vorhandensein von CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ endothelialen Progenitorzellen untersucht. Anhand eines Mausmodells wurden *in vivo* die Verminderung von Läsionsgrößen, die endotheliale Regeneration und die Neoangiogenese nach einseitiger arterieller Carotisläsion und anschließender Transplantation humaner CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+, CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelialer Progenitorzellen oder der Kontrolle bestimmt.

**Ergebnisse:** In dieser Studie konnte eine neue im peripheren Blut zirkulierende CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endotheliale Progenitorzellsubpopulation identifiziert werden, die sich in CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endotheliale Progenitorzellen weiterdifferenziert und schließlich einen reifen endothelialen Phänotyp entwickelt. Des Weiteren zeigte die CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endotheliale Progenitorzellsubpopulation funktionell eine erhöhte Aktivität bezüglich ihres vasoregenerativen Potentials verglichen mit der reiferen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelialen Progenitorzellsubpopulation. *In vitro* zeigte die CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endotheliale Progenitorzellsubpopulation eine vermehrte SDF-1a abhängige Adhäsion, was auf eine vermehrte Expression des CXCR4 Rezeptors zurückzuführen ist. Zusätzlich zeigte sie verglichen mit CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelialen Progenitorzellen ein erhöhtes quantitatives Potential, sich in reife Endothelzellen zu differenzieren.

*In vivo* werden CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endotheliale Progenitorzellen in ischämischen Regionen hochreguliert und zeigen eine erhöhte Expression in instabilen humanen koronaren Läsionen als CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endotheliale Progenitorzellen. Im Mausmodell zeigte sich, dass die Transplantation von CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelialen Progenitorzellen eine erhöhte endotheliale Regeneration und eine Verminderung von Läsionsgrößen vermittelte im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelialen Progenitorzellen.

**Diskussion:** Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endotheliale Progenitorzellen Vorläufer von CD 133+ / CD 34+ / VEGFR-2+ endothelialen Progenitorzellen mit einem höheren Potential zur vaskulären Regeneration sind. Andere Gruppen bestätigen diese Ergebnisse, wobei hauptsächlich die klassischen CD 133+ / CD 34+ / VEGFR-2+ endothelialen Progenitorzellen untersucht wurden. Die weitere Charakterisierung der endothelialen Progenitorzellen hinsichtlich früher Stammzellmarker sowie der Einfluss von Zytokinen müssen in Zukunft genauer untersucht werden. Dadurch könnten weitere Erkenntnisse bezüglich der Differenzierung und mediatorbedingten Aktivierung gewonnen werden. Die in dieser Studie erhobenen Daten weisen darauf hin, dass CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endotheliale Progenitorzellen eine Schlüsselrolle innerhalb der endothelialen Regeneration übernehmen. Diese Ergebnisse erweitern den derzeitigen Wissensstand über die heterogene Gruppe der endothelialen Progenitorzellen und implizieren neue Möglichkeiten der Therapie vaskulärer und ischämischer Erkrankungen.

## **A CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ Endothelial Progenitor Cell Subpopulation With Potent Vasoregenerative Capacities**

### **Summary**

**Introduction:** Atherosclerosis causes coronary heart disease and stroke and is the leading cause of death in the western world. Vascular regeneration as well as neoangiogenesis are considered to take an important part in the prevention and potential cure of this major disease. The prevailing dogma, that in adults the formation of new blood vessels occurs only by migration and proliferation of mature endothelial cells, was overturned in recent years by the discovery of endothelial progenitor cells. These immature circulating endothelial progenitor cells have the potential to differentiate into mature endothelial cells. In settings of tissue ischemia or endothelial damage, endothelial progenitor cells have been shown to be mobilized from the bone marrow into the circulation. From there they home to sites of injury, and incorporate into foci of neovascularisation, thereby improving blood flow and tissue recovery.

### **Methods:**

CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ and CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells were obtained from peripheral blood and isolated by density gradient centrifugation and magnetic bead purification. *In vitro* both endothelial progenitor cells subpopulations were cultured under conditions favouring endothelial-specific differentiation and the potential to differentiate into mature endothelial cells was quantified. By means of a human ischemia model trafficking of CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ and CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells was studied *in vivo* within an ischemic area. In this context, adhesion assays were performed comparing *in vitro* the stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -triggered adhesion of both endothelial progenitor cell subpopulations. Additionally, *in vivo* human coronary atherectomy specimen from stable lesions, unstable lesions, and in-stent restenosis were analyzed for the expression of CD 34- / CD 133+ and CD 34+ / CD 133+ endothelial progenitor cells. Utilizing a mouse model, the reduction of lesion size, reendothelialization, and neoangiogenesis were determined *in vivo* in nude mice after carotid artery injury and transplantation with human CD 34- / CD 133+ and CD 34+ / CD 133+ endothelial progenitor cells.

**Results:** This study demonstrates the existence of a peripheral blood-derived CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation, which differentiates into CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells and then acquires a mature endothelial phenotype. This CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation is functionally more active than the supposedly more mature CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation. *In vitro*, the CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation displays higher levels of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -triggered adhesion caused by higher expression of the CXCR4 receptor and more potently differentiates into mature endothelium as compared to CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells. *In vivo* CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells are upregulated at sites of ischemia and show higher expression levels in unstable human coronary lesions than CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells. Endothelial regeneration and lesion reduction were more potently in mice transplanted with CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells compared to CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells.

**Discussion:** This study concludes that CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells are precursors of CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells with a higher potential for vascular repair. Other groups verified these results, although mainly classical CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells were investigated. Further characterization of endothelial progenitor cells concerning early stem cell markers and the influence of cytokines need to be object of future investigations. These may contribute to a better understanding of differentiation and mediator-related activation. The data acquired in this study imply that CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ endothelial progenitor cells represent key players for endothelial regeneration. These data extend current knowledge about the heterogenous group of endothelial progenitor cells and may have implications for new possibilities in the treatment of vascular and ischemic diseases.

### **3. Einleitung**

#### **3.1. Definition der Atherosklerose**

Nach Definition der WHO ist die Atherosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima. Sie kann mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen sowie mit der Bildung eines fibrösen Gewebes und mit Kalkablagerungen einhergehen. Zusätzlich können Veränderungen der Arterienmedia vorhanden sein. Atherosklerose und Arteriosklerose werden häufig synonym verwendet.

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der arteriellen Gefäße, die praktisch im gesamten Organismus auftreten kann. Bevorzugte Regionen sind jedoch Bifurkationen und Stellen an denen es zu Verwirbelungen im Blutfluss kommt. Aufgrund von Plaquebildungen innerhalb des Gefäßes kommt es zu einer zunehmenden Einengung des Lumens. Solche Plaques können klinisch stumm verlaufen. Bei weiterer Progredienz kann es zur Minderperfusion und Ischämie der distal der Einengung liegenden Gewebe kommen. Typische klinische Symptome sind Angina pectoris, Claudicatio intermittens und transitorische ischämische Attacken. Kommt es zur Ruptur der Plaques, kann es zur Bildung gefäßverschließender Thromben und zu embolischen Ereignissen kommen, deren Endstrecke myokardiale Infarkte, Schlaganfälle und Gangrän der Extremitäten sind (Lusis 2000; Lithell 2004; Ross 1999; Libby 2000).

#### **3.2. Epidemiologie der Atherosklerose**

Die Atherosklerose ist die Hauptursache von koronarer Herzerkrankung und Schlaganfällen. Weltweit sterben jährlich über 15 Millionen Menschen an den Folgeerkrankungen der Atherosklerose. Dies sind weltweit 30 % aller Todesfälle im Jahr (Nakajima 1997). In der westlichen Welt sind über 50 % aller Todesursachen auf die Atherosklerose zurückzuführen (Lusis 2000). Zunehmende Bedeutung erlangt die Atherosklerose in Entwicklungsländern. Dort sind mittlerweile 30 % aller Todesursachen auf Atherosklerose zurückzuführen. Zusätzlich erkranken und versterben Menschen in Entwicklungsländern immer früher an den Folgen dieser Erkrankung. In der westlichen Welt zeichnet sich mittlerweile eine Abnahme der Inzidenz ab, die jedoch nicht auf therapeutische Maßnahmen, sondern auf Prävention

zurückzuführen ist. Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die finanziellen Folgekosten für Gesundheitssysteme und Volkswirtschaften, die sich aus der Atherosklerose ergeben.

Aufgrund des zunehmenden Alters der Bevölkerung werden in Zukunft die Folgeerkrankungen der Atherosklerose weiterhin die Haupttodesursache sein (Beaglehole et al. 2003; Nakajima 1997).

### **3.3. Ätiologie der Atherosklerose**

Die Ätiologie der Atherosklerose ist sehr vielgestaltig. Epidemiologische Studien der letzten 50 Jahre konnten diverse genetische und umweltbedingte Risikofaktoren identifizieren, die mit Atherosklerose assoziiert sind.

Einige wichtige bisher identifizierte Risikofaktoren sind:

- metabolische Störungen:

- erhöhte LDL/VLDL Spiegel
- verminderte HDL Spiegel
- das metabolische Syndrom

(Adipositas, Dyslipoproteinämie, essentielle Hypertonie, Glukosetoleranzstörung)

- Übergewicht
- Diabetes mellitus
- Homocystinurie
- hämatologische Faktoren

- arterielle Hypertonie
- männliches Geschlecht
- familiäre Disposition
- Fettreiche / Cholesterinreiche Diät
- Rauchen
- Bewegungsmangel
- Infektionskrankheiten (z.B. Chlamydia pneumoniae, Herpesviren)
- Systemische Inflammationskrankheiten (z.B. rheumatoide Arthritis)
- Östrogenmangel
- psychosozialer Stress

Meist liegen mehrere Risikofaktoren vor, die sich zum Teil addieren oder potenzieren können (Lusis 2000). Die Gewichtung der einzelnen Risikofaktoren ist abhängig von der Lokalisation der Atherosklerose. Bei cerebraler Atherosklerose ist Hypertonie der quantitativ wichtigste Risikofaktor. Bei Atherosklerose der peripheren Arterien konnte Rauchen als wichtigster Risikofaktor identifiziert werden. Bei der koronaren Herzerkrankung sind erhöhte Blutfettwerte als Hauptrisikofaktor seit langem bekannt, wobei das metabolische Syndrom zunehmend an Bedeutung gewinnt (Lithell 2004; Libby 2002). Aktuelle Studien der Pathophysiologie der Atherosklerose lassen ein enges Zusammenspiel der einzelnen Risikofaktoren erkennen.

### **3.4. Pathophysiologie der Atherosklerose**

Die Pathophysiologie der Atherosklerose besteht aus fünf Hauptsäulen, die sich gegenseitig beeinflussen. Hierzu gehören: *Verwirbelungen im Blutfluss*, *Endothelschäden*, *Lipidspeicherstörungen*, *Inflammation* und *Proliferation*. Diese Faktoren wirken von der frühen Entstehung der Atherosklerose bis zum rupturierten Plaque in unterschiedlichem Maße aufeinander ein.

Die Pathophysiologie der Atherosklerose ist schematisch in Abbildung 1 (siehe Seite 18) gezeigt.

#### **3.4.1. Auslöser der Atherosklerose**

Im gesunden arteriellen Gefäß kommt es bei zirkulierenden Zellen zu keiner Adhäsion an die Endothelschicht. Auslösende Faktoren wie z.B. Hypercholesterinämie, Rauchen, arterielle Hypertonie, Bewegungsmangel, Hyperglykämie und Insulinresistenz können jedoch einen inflammatorischen Prozess initiieren (Ross 1999; Libby 2002).

Der bekannteste auslösende Faktor ist eine *Lipidspeicherstörung* in der Intima der Arterienwand. Es kommt zur Akkumulation von LDL in der subendothelialen Matrix. Dies geschieht durch passive Diffusion von LDL zwischen den Gap-Junctions der Endothelzellen. Innerhalb der Intima werden die LDL-Partikel über Oxidation, Lipolyse, Proteolyse und Aggregation modifiziert. Diese modifizierten Lipoproteinpartikel initiieren einen inflammatorischen Prozess (Lusis 2000).



Die *Inflammation* spielt in der Entstehung und Unterhaltung der Atherosklerose eine wesentliche Rolle. Neben modifizierten Lipoproteinpartikeln können zahlreiche andere Faktoren eine Inflammation auslösen. Hierzu gehören: hämodynamische Faktoren, erhöhte Homocysteinspiegel, verminderte Östrogenspiegel sowie infektiöse Agenzien (z.B. Chlamydia pneumoniae, Herpesviren). Der Einfluss des Diabetes mellitus auf die Inflammation wird vermutlich über glykosilierte Proteine in der Intima vermittelt. Diese interagieren mit Endothelzellen und beeinflussen den inflammatorischen Prozess. Bisher konnten diverse proinflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-1 $\beta$  oder der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  identifiziert werden. In ihrer Endstrecke bewirken sie eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen. Dazu gehören das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), P- und E-Selektine und andere mittlerweile identifizierte Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen der Gefäßinnenwand. Diese Adhäsionsmoleküle vermitteln eine Anheftung zirkulierender Monozyten und T-Lymphozyten an die Endothelzellen (Libby 2006; Lusis 2000).

Ein weiterer Auslöser sind *Verwirbelungen im Blutfluss*. Ein laminarer Blutfluss fördert die Bildung von atheroprotektiven Mechanismen. Hierzu gehören die vermehrte Expression antioxidativer Enzyme wie der Superoxid Dismutase und der NO-Synthase. Beide Enzyme hemmen z.B. die Expression von VCAM-1. Verwirbelungen im Blutfluss führen zu einer Hemmung dieser atheroprotektiven Enzyme und konsekutiv vermehrter VCAM-1 Expression (Libby 2006). Zusätzlich sind bei laminarem Blutfluss die ellipsoiden Endothelzellen in Strömungsrichtung ausgerichtet sind. In Gebieten mit Verwirbelungen besteht keine gerichtete Ausrichtung der Endothelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass letztere eine erhöhte Permeabilität für LDL aufweisen (Lusis 2000).

Eine zentrale Funktion im gesunden Gefäß übernimmt die intakte Endothelschicht. In atherosklerotischen Läsionen können *Endothelschäden* über Mediatoren thrombotische und inflammatorische Prozesse modulieren sowie Einfluss auf den Gefäßtonus nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Entfernung der Endothelschicht zu einer massiven Proliferation und Migration glatter Muskelzellen mit konsekutiver Lumeneinengung kommt. Nach Regeneration der Endothelschicht ist die Lumeneinengung wieder rückläufig (Gimbrone 1999).

Die Auslösung einer Atherosklerose wird auch als „response to injury“ (Reaktion auf eine Verletzung) bezeichnet, wobei Lipoproteine oder andere verletzende Agenzien als Auslöser wirken (Lusis 2000).

### **3.4.2. Die frühe Entwicklung eines atherosklerotischen Plaques**

Vermittelt durch einen chemotaktischen Gradienten kommt es zur Diapedese von adhärenenten Monozyten und T-Lymphozyten durch die Endothelschicht in die Intima des Gefäßes. Hauptverantwortlich ist das monozytenchemotaktische Protein-1 (MCP-1). Innerhalb der Intima entwickeln sich die Monozyten zu Makrophagen. Diese phagozytieren die abgelagerten Lipoproteinpartikel bis sie lipidüberladen zu Schaumzellen werden. Es kommt zur Apoptose der Schaumzellen und zur wiederholten Phagozytose der freigewordenen Lipoproteinpartikel aus dem nekrotischen Bezirk durch weitere Makrophagen (Ross 1999; Libby 2002). Unterhalten wird dieser Prozess durch die Teilung von Makrophagen innerhalb der Läsion und die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie den Makrophagen Kolonie Stimulationsfaktor (M-CSF). Durch eingewanderte T-Lymphozyten wird dieser inflammatorische Prozess zusätzlich unterstützt. Hierbei wurden diverse Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren identifiziert, die hier nicht näher erläutert werden (Lusis 2000). Die frühe Entwicklung atherosklerotischen Plaques wird hauptsächlich über die Mediatoren VCAM-1, MCP-1 und M-CSF stimuliert. Es entstehen die ersten atherosklerotischen Läsionen, die auch als sogenannte „fatty streak“ bezeichnet werden. Diese können schon in jungen Jahren nachweisbar sein (Libby 2006).

### **3.4.3. Die Entwicklung zu großen atherosklerotischen Plaques**

Als Konsequenz aus der Inflammation innerhalb der Intima kommt es zur Migration und *Proliferation* von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima. Makrophagen und T-Lymphozyten stimulieren über die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren diesen Prozess. Die stimulierten glatten Muskelzellen produzieren eine extrazelluläre Matrix, die zusammen mit den eingewanderten glatten Muskelzellen eine Hülle um den lipidüberladenen, nekrotischen Kern bildet und ihn stabilisiert (Schwartz et al. 1997; Lusis 2000; Libby 2002). Im Zuge der Plaqueprogression kann es vermittelt durch Monozyten zusätzlich zu Kalzifikationen innerhalb des nekrotischen Kerns kommen, vergleichbar mit der Osteosynthese in Knochen (Lusis et al. 2005). Der Plaque wächst zuerst in Richtung Media

des Gefäßes. Ist dieser Raum ausgeschöpft breitet er sich lumenwärts aus. Das Wachstum eines Plaques kann über Jahre langsam progredient verlaufen, sistieren oder rasch progredient verlaufen. Wesentlich ist der Einfluss der Risikofaktoren, die je nach Schwere, den inflammatorischen Prozess unterhalten. Dies erklärt weshalb die Atherosklerose über Jahre asymptomatisch verlaufen oder schon in jungen Jahren zu schweren Folgeerkrankungen führen kann.

#### **3.4.4. Die Plaqueruptur**

Die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques mit darauf folgenden akuten ischämischen Ereignis ist die Hauptkomplikation der Atherosklerose. Rupturgefährdete Plaques haben in der Regel eine dünne fibröse Hülle. Hingegen weisen stabile Plaques eine dicke fibröse Hülle auf (Lusis 2000). Die Aufrechterhaltung der fibrösen Hülle wird gewährleistet durch die Produktion extrazellulärer Matrix von glatten Muskelzellen. Diese Produktion wird stimuliert durch inflammatorische Faktoren. Gleichzeitig fördern inflammatorische Faktoren (z.B. Interferon- $\gamma$ ) aber auch einen Abbau der extrazellulären Matrix. Es besteht ein fragiles Gleichgewicht zwischen auf- und abbauenden Prozessen der fibrösen Hülle. Dominieren abbauende Faktoren, kann es zu erhöhter Rupturanfälligkeit der fibrösen Hülle kommen. Zusätzlich fördern inflammatorische Faktoren die Ablösung von Endothelzellen von der fibrösen Hülle. Der Verlust des endothelialen Schutzes fördert die Rupturanfälligkeit der fibrösen Hülle und trägt zu zunehmender Instabilität bei. Kommt es z.B. zu plötzlichen Veränderungen in der Hämodynamik (kurzfristige Hypertonie), kann es letztendlich zur Plaqueruptur kommen (Libby 2000; Libby 2002; Lusis 2000). Der nun freiliegende hoch thrombophile Kern aktiviert die Gerinnungskaskade und es kommt zur Bildung eines Thrombus. In der Folge kann sich dieser Thrombus einerseits organisieren und fibrös umgewandelt werden. Dadurch kommt es zu einer zunehmenden Verengung des Gefäßlumens. Die Folgen können sein: Zunahme von Angina pectoris, Claudicatio intermittens oder transitorischer ischämischer Attacken. Andererseits kann es aber auch zur Ablösung des Thrombus mit nachfolgender Embolie kommen. Es kommt zu akuten myokardialen Infarkten, Schlaganfällen und kritischer Extremitätenischämie (Libby 2002).

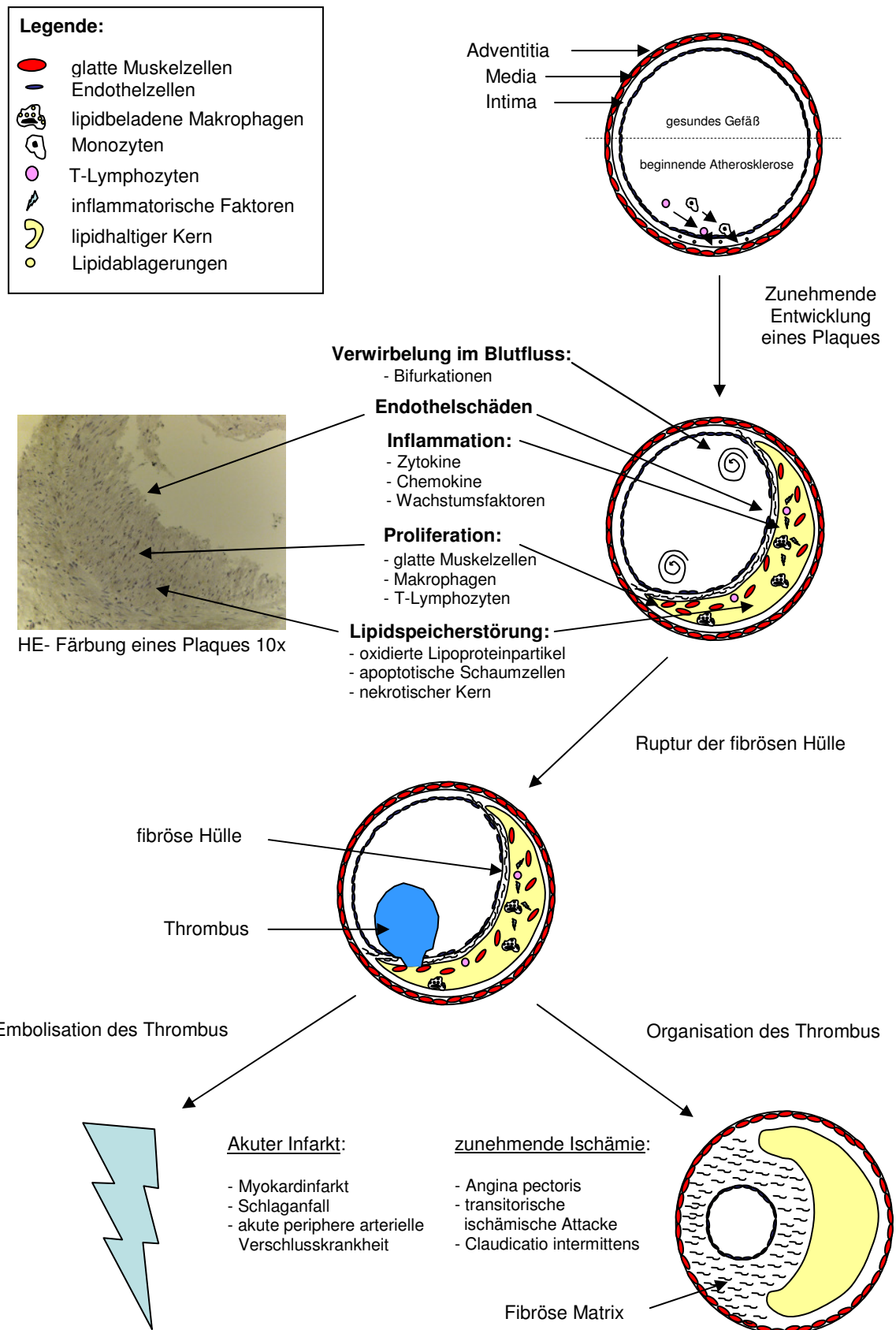


Abbildung 1:

Schematische Darstellung der Pathophysiologie der Atherosklerose. Erläuterungen siehe Text

### **3.4.5. Heutige Therapiemöglichkeiten**

Die sinnvollste Therapiemaßnahme der Atherosklerose besteht in der Prävention. Hierzu gehören die Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Übergewicht und Nikotinabusus. Primär kann dieses Ziel diätisch angestrebt werden, wobei ein zusätzlicher positiver Effekt bei vermehrter sportlicher Betätigung nachgewiesen werden konnte (Laufs et al. 2004). Sollten diese Maßnahmen nicht ausreichend greifen, stehen pharmakotherapeutische Möglichkeiten zur Verfügung. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise zu erwähnen:  $\beta$ -Blocker, Nitrate, Statine, Fibrate, Angiotensin-II Rezeptorantagonisten, Thrombozytenaggregationshemmer, Antidiabetika und Antihypertensiva. Das Ziel all dieser Maßnahmen ist es, die Progression der zunehmenden Ischämie bis zum Endstadium des Infarktes herauszuzögern. Kommt es doch zum akuten ischämischen Ereignis stehen die Lysetherapie und interventionell die perkutane transluminale Angioplastie, die Stentimplantation oder Bypassoperationen zur Verfügung (Libby 2006; Libby et al. 2005; Lusis 2000).

### **3.5. Neue Therapiemöglichkeiten**

Ein neuer Therapieansatz wäre die Regeneration der endothelialen Auskleidung des Gefäßes. Einerseits kann dies zu einer Reduktion der Läsionsgröße führen (Gimbrone 1999), andererseits können rupturgefährdete Plaques durch eine geschlossene endotheliale Abdeckung der fibrösen Hülle stabilisiert werden (Libby 2002; Lusis 2000). Insgesamt könnte somit der Progress der Atherosklerose verzögert werden, wenn nicht sogar ein Regress der atherosklerotischen Läsionen erzielt werden.

Die Regeneration und Proliferation endothelialer Zellen nach Gewebetraumen, während der Neoangiogenese oder nach vaskulären Verletzungen wurde lange Zeit als ein von benachbarten Endothelzellen innerhalb intakter Areale der Intima ausgehender Prozess betrachtet (Carmeliet et al. 1997). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass aus dem Knochenmark stammende zirkulierende Stamm- und Progenitorzellen eine wichtige Funktion bei der Geweberegeneration innerhalb des kardiovaskulären Systems zukommt (Asahara et al. 1999; Shintani et al. 2001). Mehrere Studien konnten einen positiven Effekt bezüglich der Geweberegeneration nach Myokardinfarkt, ausgehend von mobilisierten, aus dem

Knochenmark stammenden (Orlic et al. 1999) oder transplantierten Stammzellen demonstrieren (Strauer et al. 2002; Kocher et al. 2001; Assmus et al. 2006; Schächinger et al. 2006). Näher untersucht wurden insbesondere endotheliale Progenitorzellen (EPC). Sie repräsentieren eine Untergruppen der aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen, denen eine wichtige Funktion in der physiologischen sowie der pathophysiologischen Neoangiogenese (Asahara et al. 1997) und der vaskulären Regeneration nach Myokardinfarkten zukommt (Assmus et al. 2002).

Erweitert wurde dieses Verständnis durch Hinweise, dass zirkulierende Stammzellen und aus dem Knochenmark stammende EPC sich innerhalb der Zirkulation frei bewegen können. Sie können so in unterschiedliche Organe migrieren, sich vor Ort in organspezifische Zellen weiterdifferenzieren oder zum dort vorhandenen Stammzellpool beitragen (Blau et al. 2001). Mehrere Studien, die die Rolle aus dem Knochenmark stammender EPC untersuchten, konnten zeigen, dass die Anzahl zirkulierender EPC nach schweren Traumen (z.B. Myokardinfarkt, koronararterielle Bypassoperation, Verbrennungen) signifikant zunimmt (Gill et al. 2001; Shintani et al. 2001). Im Gegensatz dazu ist die Anzahl zirkulierender EPC bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren vermindert. Dieses weist auf eine wichtige Funktion von EPC bei kardiovaskulären Erkrankungen hin (Hill et al. 2003; Werner et al. 2006).

Zusammenfassend kann man sagen, dass in ischämischem Gewebe oder bei Störung der Integrität der endothelialen Zellschicht gezeigt werden konnte, dass EPC aus dem Knochenmark in die Zirkulation mobilisiert werden. Von dort aus werden sie in die geschädigten Gewebe rekrutiert sowie an Orten von Neovaskularisation eingebracht. Dadurch kommt es zu einer verbesserten Durchblutung und Gewebsregeneration (Rafii et al. 2003; Urbich et al. 2004; Werner et al. 2003; Laufs et al. 2004).

EPC sind eine heterogene Gruppe von Zellen. Sie werden durch Oberflächenmarker wie CD 34, CD 133, VEGFR-2 (KDR oder Flk-1) sowie durch die Aufnahme von Dil-Ac-LDL und die Bindung von endothelspezifischen Lektinen wie *Ulex europaeus* charakterisiert. Allerdings wird CD 34 auch in einem frühen Stadium von Endothelzellen exprimiert. Dieses Problem konnte durch die Entdeckung des früheren und spezifischeren Stammzellmarkers CD 133 behoben werden. CD 133 wird auf unreifen Stammzellen verstärkt exprimiert und verliert sich im Zuge der weiteren endothelialen Differenzierung (Peichev et al. 2000; Gehling

et al. 2000; Handgretinger et al. 2003; Shmelkov et al. 2005). Trotzdem ist die exakte Charakterisierung der EPC noch unvollständig. Bisher lassen sie sich lediglich in eine weniger differenzierte CD 133+ / CD 34+ / VEGFR-2+ Subpopulation und eine weiter differenzierte CD 133- / CD 34+ / VEGFR-2+ Subpopulation einteilen.

Ausgehend von ihrem hohen vasoregenerativen Potential stellen EPC, als zirkulierende Stammzellen, eine vielversprechende neue Therapieoption der Atherosklerose dar. Allerdings ist noch wenig über ihre genaue Charakterisierung bekannt. Zusätzlich fehlen genauere Erkenntnisse über ihre funktionellen Fähigkeiten sowie die Interaktion zwischen initialem Gewebeschaden und letztendlicher EPC Rekrutierung in ischämischem Gewebe.

### **3.6. Fragestellung dieser Arbeit**

Die Fragestellung dieser Arbeit umfasst zwei Hauptaspekte:

- Gibt es EPC Subpopulationen, die ein hohes vasoregeneratives Potential haben?
- Wenn ja, welche Rolle spielen diese innerhalb der Vasoregeneration?

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, die heterogene Gruppe der EPC phänotypisch sowie funktionell genauer zu beschreiben.

Zur genaueren phänotypischen Beschreibung wurden zirkulierende EPC auf die Expression der klassischen EPC Oberflächenmarker CD 34, CD 133 und VEGFR-2 sowie den monozytären Oberflächenmarker CD 14 untersucht. Hierdurch sollten mögliche Subpopulationen innerhalb der Gruppe der EPC identifiziert werden.

Zur genaueren funktionellen Beschreibung wurden diese EPC Subpopulationen *in vitro* auf ihr weiteres Potential zur endothelialen Differenzierung untersucht. Zusätzlich sollten statische Adhäsionsversuche Aussagen über ihre Adhäsion unter dem Einfluss von Chemokinen geben. Dadurch sollten funktionell wichtige EPC Subpopulationen ausgemacht werden.

Eine weitere Zielsetzung war es, die gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* zu bestätigen. Hierzu wurde anhand eines Ischämiemodells die Mobilisierung der EPC Subpopulationen untersucht. Zusätzlich wurden humane Atherektomieproben auf die Expression der EPC Subpopulationen

hin überprüft. Abschließend sollte anhand eines Mausmodells das vasoreparative Potential der EPC Subpopulationen überprüft werden.



### **3. Material und Methoden**

#### **4.1. Material**

##### **4.1.1. Chemikalien und Reagenzien**

Amphotericin B, Clonetics Cell Systems, Walkersville Inc., Walkersville MD, USA  
Biocoll Dichtegradientenlösung, Biochrom AG, Berlin  
Bovines Serumalbumin (BSA), Serra, Heidelberg  
Boviner Gehirnextrakt, Proteingehalt ca. 3.0 mg/ml, Clonetics Cell Systems, Walkersville Inc., Walkersville MD, USA  
CD 133 Zellisolutionskit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach  
CD 34 Progenitorzellisolutionskit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach  
Endothelzell Basalmedium (EBM), Clonetics Cell Systems, Walkersville Inc., Walkersville MD, USA  
Ethanol 99%, Merck, Darmstadt  
Fibronektin aus humanem Plasma, Sigma Aldrich, Steinheim  
Fluoreszierendes Eindeckmedium DAKO®, Dako Corporation, Carpinteria, USA  
Fetales Kälberserum (FKS), Invitrogen, Karlsruhe  
GA-1000, Gentamicin Sulfat, Clonetics Cell Systems, Walkersville Inc., Walkersville MD, USA  
HEGF, humaner epidermaler Wachstumsfaktor, Clonetics Cell Systems, Walkersville Inc., Walkersville MD, USA  
Hydrocortison, 1,0 MG/ML Hydrocortisone, Clonetics Cell Systems, Walkersville Inc., Walkersville MD, USA  
Ketanest, Pharmacia, Erlangen  
NaCl 0.9 % (Kochsalzlösung), B. Braun, Melsungen  
Paraformaldehyd (PFA), Merck, Darmstadt  
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 10x konz., ohne Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid, steril filtriert, Sigma Chemical CO., Steinheim  
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 10x konz., mit Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid, steril filtriert, Sigma Chemical CO., Steinheim  
PKH 26 rot fluoreszierendes Zellkopplungskit, Sigma Aldrich, Steinheim  
Rh SDF-1a / PBSF / CXCL12, R&D Systems Minneapolis, USA

Rompun 2%, Bayer, Leverkusen

RPMI 1640 Medium-L-Glutamin, Invitrogen, Karlsruhe

Tissue Tek OCT Einfriermedium, Miles Laboratories, Naperville IL, USA

Trypsin, Promocell, Heidelberg

Tween 20, Sigma Chemical CO., Steinheim

VECTASHIELD® Eindeckmedium mit DAPI, Vector Laboratories Inc., Burlingame, U.S.A.

Ziegenserum, Invitrogen, Karlsruhe

#### 4.1.2. Puffer

PBS ohne $\text{Ca}^{2+}$	1x konz. PBS ohne Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid, steril filtriert
PBS mit $\text{Ca}^{2+}$	1x konz. PBS mit Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid, steril filtriert
Collumpuffer	1x konz. PBS ohne Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid, steril filtriert + FKS (1:10), 4°
FACS-Puffer	1x konz. PBS ohne Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid, steril filtriert + FKS (1:10), 4°
EBM	Endothelzellmedium supplementiert mit: hEGF epidermaler Wachstumsfaktor, GA-1000 Gentamicin Sulfat, Amphotericin B, boviner Gehirnextrakt Proteingehalt ca. 3.0 mg/ml, Hydrocortison 1,0 MG/ML und 20% fetalem Kälberserum, steril
Waschpuffer	1x konz. PBS ohne Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid mit 0,1 % Tween 20 (1ml/l)

Tabelle 1: Verwendete Puffer

Es kam ausschließlich deionisiertes und bidestilliertes Wasser zur Verwendung. Zur Zellkulturverwendung wurde dieses Wasser zusätzlich noch autoklaviert.

#### 4.1.3. Antikörper für FACS und Immunhistochemie

Dil-Ac-LDL, Harbor Bio-Products, Norwood, USA

FITC- markiertes *Ulex europaeus* Lektin (10µg/ml), Sigma Aldrich, Steinheim

Antikörper für FACS und Immunhistochemie siehe auch Tabellen 2 - 5

<b>Antikörper- bezeichnung</b>	<b>Fluoreszenz</b>	<b>hergestellt in (Tier)</b>	<b>Ig- Fraktion</b>	<b>Hersteller- firma</b>
CD 14 monoklonaler anti-humaner Antikörper, Klon M5E2	FITC	Maus	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
CD 31 (PECAM-1) monoklonaler anti- Maus Antikörper, Klon MEC13.3	Über sekundär bzw. Tertiär- antikörper	Ratte	IgG2a,κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
CD 31 monoklonaler anti-humaner Antikörper, Klon WM59	FITC	Maus	IgG1, κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
CD 34 monoklonaler anti-humaner Antikörper, Klon 581	FITC	Maus	IgG1, κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
CD 34 monoklonaler anti-humaner Antikörper, Klon 581	APC	Maus	IgG1, κ	BD Biosciences, San Jose, USA
CD 133/2 monoklonaler anti-humaner Antikörper, Klon 293C3	PE	Maus	IgG2b	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CXCR4 monoklonaler anti-humaner Antikörper, Klon 12G5	FITC	Maus	IgG2a	R&D Systems, Minneapolis, USA
FLK/KDR/VEGFR2 Ab-1, polyklonaler anti- humaner/Maus/Ratte Antikörper	Über sekundär bzw. Tertiär- antikörper	Kaninchen	polyklonal	Dianova GmbH, Hamburg

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper für FACS und Immunhistochemie

<b>Antikörperbezeichnung</b>	<b>hergestellt in (Tier)</b>	<b>konjugiert mit</b>	<b>Herstellerfirma</b>
anti-Kaninchen Ig polyklonal	Ziege	Biotin	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
anti-Ratte Ig polyklonal	Ziege	Biotin	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper für FACS und Immunhistochemie

<b>Antikörperbezeichnung</b>	<b>bindet an</b>	<b>konjugiert mit</b>	<b>Herstellerfirma</b>
Streptavidin-Fluorescein Isothiocyanat (FITC) Konjugat (SAV-FITC)	Biotin	FITC	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin-Peridinin Chlorophyll-a Protein (PERCP) Konjugat (SAV- PERCP)	Biotin	PERCP	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Tabelle 4: Verwendete Tertiärantikörper für FACS und Immunhistochemie

<b>Antikörper- bezeichnung</b>	<b>Fluoreszenz</b>	<b>bindet an</b>	<b>hergestellt in (Tier)</b>	<b>Ig- Fraktion</b>	<b>Hersteller- firma</b>
APC (Anti- Dansyl)	APC	Un- spezifisch	Maus	IgG2b, $\kappa$	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
FITC	FITC	Un- spezifisch	Maus	IgG2a	BD Biosciences, San Jose, USA
PE	PE	Un- spezifisch	Maus	IgG1, $\kappa$	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin- Peridinin Chlorophyll-a Protein (PERCP) Konjugat (SAV-PERCP)	PERCP	Biotin			BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Tabelle 5: Verwendete Isotypenkontrollen für FACS und Immunhistochemie

#### **4.1.4. Geräte und Materialien**

Zellkulturplättchen, Nunc, Wiesbaden

BD Cellquest Software™ Pro Version 4.0.2

Diskus (Polyvinyl Alkohol Schwämmchen), Rippey, El Dorado Hills California, USA

FACS Gerät, BD Becton Dickinson, Heidelberg

FACS Röhrchen, BD Becton Dickinson, Heidelberg

Leica Cryostat CM1900 (7µm)

Lucia Measurement Software Version 4.6

Microsoft® Excel Software 2002

Mikrosphären, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe

Natrium-Citrat Röhrchen (S-Monovette), Sarstedt, Nümbrecht

Nikon E 600 Mikroskop

Nikon TS 100 Mikroskop

Nikon DXM 1200F Digitalkamera

Leica MZ6 Mikroskop

Nitrozellulose Filter, Millipore, Schwalbach

Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger, Sigma Aldrich, Steinheim

Venenverweilkanüle, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt

24 bzw. 96 Lochplatten, Greiner, Frickenhausen

#### **4.1.5. Versuchstiere**

In der Studie wurden immunsupprimierte Nacktmäuse (n = 15) der Firma Charles River Laboratories, Sulzfeld verwendet.

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Isolation zirkulierender humaner EPC Subpopulationen

Zur Gewinnung humaner EPC wurde gesunden freiwilligen Probanden ( $n = 10$ , Alter  $29 \pm 6$  Jahre, 6 Männer, 4 Frauen) peripher venöses Blut in 5 ml Citrat Röhrchen (Sarstedt) entnommen. Um daraus die EPC zu isolieren wurde das Blut zuerst verdünnt und anschließend mittels eines Dichtegradienten in lymphozytäre, mononukleäre und erythrozytäre Fraktionen aufgetrennt. Die EPC konnten dann aus der mononukleären Zellschicht weiter isoliert werden. Hierzu wurden die Blutproben mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 1:1 verdünnt und auf Biocollldichtegradientenlösung (Biochrom) geladen. Die Proben wurden anschließend für 20 min bei 500 g und  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ohne Bremse zentrifugiert. Der Buffycoat wurde abgesaugt und wiederum 1:1 mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) verdünnt und für 5 min bei 1500 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 1000  $\mu\text{l}$  PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) resuspendiert und in einer 1:100 Verdünnung in einer Neubauerzählkammer gezählt.

Um die EPC weiter nach ihren Oberflächenmarkern CD 34 und CD 133 aufzutrennen wurden oberflächenmarkerspezifische Isolationskits verwendet. Dabei binden in einem ersten Schritt spezifische magnetisch gekoppelte Antikörper an der Zelloberfläche der zu isolierenden Zellen. In einem zweiten Schritt werden diese markierten Zellen langsam in einem magnetischen Feld durch einen Zylinder (Collum) filtriert, mit der Konsequenz, dass die magnetisch gekoppelt markierten Zellen innerhalb des Zylinders verbleiben und die nicht markierten Zellen ausgespült werden.

Zur Auftrennung in CD 34+ und CD 34- Zellen wurde das CD 34 Progenitorzellisolationskit (Miltenyi Biotec) entsprechend der Produkthanleitung verwendet. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1500 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Bremse zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet in zellzahlabhängigem Volumen (300  $\mu\text{l}$  pro  $1 \times 10^7$  Zellen) mit Collumpuffer ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) resuspendiert. In einem ersten Schritt wurde die Zellsuspension mit einer FcR Blocklösung und einem Haptenantikörper (jeweils 100  $\mu\text{l}$  pro  $1 \times 10^7$  Zellen) versetzt und für 15 min bei  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Lichtausschluss inkubiert. Hierdurch wurden unspezifische Bindungen geblockt und das spezifische Epitop (CD 34) durch einen primären Antikörper gebunden. Nach Waschen der Suspension mit Collumpuffer ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) im Verhältnis 1:10, Zentrifugieren für 5 min bei

1500 rpm und 4 °C mit Bremse wurde der Überstand verworfen und das Pellet nochmals im zellzahlabhängigem Volumen (400 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) mit Collumpuffer (4 °C) resuspendiert. In einem zweiten Schritt wurde die Suspension mit Anti-Hapten *Micro Beads* (100 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) versetzt und für 15 min bei 6-12 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Dieser magnetisch gekoppelte sekundäre Antikörper bindet den haptenspezifischen Primärantikörper, welcher die Auftrennung in einem Magnetfeld ermöglicht. Nach Waschen der Suspension mit Collumpuffer (4 °C) im Verhältnis 1:10, nochmaligem Zentrifugieren für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse wurde der Überstand verworfen, und das Pellet im zellzahlabhängigen Volumen (500 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) mit Collumpuffer (4 °C) resuspendiert. Im Folgenden wurde die Zellsuspension durch einen großen (LS) Zylinder in einem Magnetfeld filtriert. Das Filtrat mit CD 34- Zellen wurde bis zur weiteren Aufbereitung auf Eis gelagert. Die im Zylinder verbliebenen CD 34+ Zellen wurden mit 10 ml Collumpuffer (4 °C) ausgespült, für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im zellzahlabhängigen Volumen (500 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) mit Collumpuffer (4 °C) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension, um eine höhere Reinheit zu erreichen, ein zweites Mal durch einen kleinen (MS) Zylinder in einem Magnetfeld filtriert. Nach Ausspülen des Zylinders mit 2 ml Collumpuffer (4 °C) wurden die zweifach aufgereinigten CD 34+ Zellen bis zur weiteren Aufbereitung auf Eis gelagert.

Zur weiteren Auftrennung in CD 34- / 133+ Zellen wurde das CD 133 Zellisolationskit (Miltenyi Biotec) entsprechend der Produktanleitung verwendet. Die zuvor gewonnene CD 34- Zellsuspension wurde für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in zellzahlabhängigen Volumen (300 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) mit Collumpuffer (4 °C) resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit CD 133 Blocklösung und CD 133 *Micro Beads* (jeweils 100 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) versetzt und für 30 min und 6 °C unter Lichtausschluss inkubiert. In diesem Fall ist der epitopspezifische Antikörper bereits an den magnetischen Anteil gekoppelt, weshalb nur ein Schritt erforderlich ist. Nach Waschen der Suspension mit Collumpuffer (4 °C) im Verhältnis 1:10 und nochmaligem Zentrifugieren für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse wurde der Überstand verworfen, das Pellet im zellzahlabhängigen Volumen (500 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) mit Collumpuffer (4 °C) resuspendiert und durch einen großen (LS) Zylinder in einem Magnetfeld filtriert. Die im Zylinder verbliebenen CD 34- / 133+ Zellen wurden mit 10 ml Collumpuffer (4 °C) ausgespült, für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse zentrifugiert

und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im zellzahlabhängigen Volumen (500 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) mit Collumpuffer (4 °C) resuspendiert und, um eine höhere Reinheit zu erreichen, ein zweites Mal durch einen kleinen (MS) Zylinder in einem Magnetfeld filtriert. Nach Ausspülen des Zylinders mit 2 ml Collumpuffer (4 °C) wurden die zweifach aufgereinigten CD 34- / CD 133+ Zellen bis zur weiteren Aufbereitung auf Eis gelagert. Abschließend wurden zur Bestimmung der isolierten Zellzahlen die CD 34+ und CD 34- / CD 133+ Suspensionen für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1000 µl PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  (22 °C) resuspendiert und in einer 1:100 Verdünnung in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Alle Blutentnahmen, an gesunden menschlichen Freiwilligen, wurden mit schriftlichem Einverständnis der Probanden sowie im Rahmen institutioneller Richtlinien und ethischer Anträge durchgeführt.

#### **4.2.2. Kultur humaner EPC Subpopulationen**

Zur *in vitro* Kultur wurden die wie oben beschrieben isolierten CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen unter die Endotheldifferenzierung fördernden Bedingungen, auf 24 Lochplatten (Greiner) für jeweils 24 h und 4 d kultiviert (n = 10). Zu Beginn der Kultur sowie zu den Zeitpunkten 24 h und 4 d wurden die Zellen sowohl qualitativ als auch quantitativ auf ihre Oberflächenmarker (CD 34, CD 133 und CD 31), sowie die Bindung von *Ulex europaeus* Lektin und die Aufnahme von Dil-Ac-LDL untersucht. Hierdurch sollten vergleichende Aussagen zu ihrer weiteren Differenzierung im Verlauf und ihrem replikativen Potential gemacht werden können.

Die 24 Lochplatten wurden so vorbereitet, dass ein Vergleich der Subpopulation bestehend aus CD 34+ Zellen sowie CD 34- / CD 133+ Zellen und einer Kontrollgruppe bestehend aus CD 34- / CD 133- Zellen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (24 h und 4 d) möglich war. Dazu wurden jeweils vier Löcher pro Subpopulation und Kontrolle mit Fibronectinlösung (Sigma) beschichtet. Dabei waren für jede Subpopulation und Kontrolle jeweils zwei Löcher für die Untersuchung nach 24 Stunden und zwei Löcher für die Untersuchung nach vier Tagen vorgesehen. Die zwei Löcher erlaubten pro Zeitpunkt sowohl eine Untersuchung mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortieranalyse als auch eine immunhistochemische Untersuchung mittels eines eingelegten Zellkulturplättchens (Nunc). Hierzu wurden 24 Lochplatten mit jeweils 300 µl einer humanen Fibronectinlösung (Sigma) und PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  (22 °C) im Verhältnis 1:100 verdünnt pro Loch beschichtet. Die 24 Lochplatten wurden für



30 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde die Fibronektinlösung abgesaugt und es wurden 500 µl EBM (37 °C) (Clonetics Cell Systems) pro vorbereitetes Loch vorgelegt. Die isolierten Zellpopulationen wurden nach Zählung in einer Neubauerzählkammer zu gleichen Zellzahlen pro Bedingung (CD 34+; CD 34- / CD 133+; CD 34- / CD 133- Zellen) in 2500 µl EBM (37 °C) resuspendiert und zu jeweils 500 µl Zellsuspension pro Bedingung und Zeitpunkt (24 h und 4 d) in die entsprechenden Löcher gegeben. Die verbliebenen 500 µl Zellsuspension pro Bedingung wurden zur fluoreszenzaktivierten Zellsortieranalyse des 0-Zeitpunktes verwendet. Die 24 Lochplatten wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h bzw. 4 d inkubiert, wobei alle zwei Tage 500 µl EBM pro Loch abpipettiert und durch 500 µl frisches EBM (37 °C) ersetzt wurden. Nach 24 h bzw. 4 d wurden die Zellen der einzelnen Bedingungen zur fluoreszenzaktivierten Zellsortieranalyse folgendermaßen vorbereitet: Die Löcher wurden entsprechend der Bedingungen CD 34+, CD 34- / CD 133+ und CD 34- / CD 133- Zellen abpipettiert und danach dreimal mit 1000 µl PBS ohne Ca<sup>2+</sup> (37 °C) gespült und wiederholt abpipettiert. Die verbliebenen adhärennten Zellen wurden mittels Trypsin (Promocell) abgelöst. Hierzu wurde jeweils 300 µl Trypsin (37 °C) pro Loch hinzugegeben und für 1-2 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Um die Reaktion zu beenden wurden abschließend die Löcher mit 1000 µl EBM (37 °C) aufgefüllt, gespült und abpipettiert. Zur lichtmikroskopischen Bestimmung der Zellzahlen wurden die CD 34+ , CD 34- / CD 133+ und CD34- / CD 133- Zellsuspensionen für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1000 µl PBS ohne Ca<sup>2+</sup> (22 °C) resuspendiert und in einer 1:100 Verdünnung in einer Neubauerzählkammer gezählt. Die weitere Untersuchung der CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen nach 24 h bzw. 4 d in Kultur wurde mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortieranalyse (FACS) durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbung der Zellkulturplättchen zu den Zeitpunkten 24 h bzw. 4 d ist unter Immunhistochemie beschrieben. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturbank durchgeführt.

#### **4.2.3. Humane koronare Atherektomien**

Zur Bestimmung von CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen innerhalb von stabilen und instabilen koronaren Läsionen sowie In-Stent-Restenosen wurden humane koronare Artherektomiegewebeproben untersucht. Hierzu wurden Gewebeproben von Patienten mit stabiler Angina pectoris, instabiler Angina pectoris und In-Stent-

Restenosen untersucht, die im Rahmen routinemäßiger perkutaner transluminaler Koronarangioplastie artherektomiert wurden. Alle Gewebeproben wurden mit dem schriftlichen Einverständnis der Patienten und im Rahmen ethischer Anträge verwendet. Einen Überblick über die Patientendaten gibt Tabelle 6.

Im Folgenden sind die klinischen Definitionen von stabiler Angina pectoris, instabiler Angina pectoris und In-Stent-Restenosen kurz aufgeführt. Nach den aktuellen Richtlinien der American Heart Association und der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie ist die stabile Angina pectoris definiert als reproduzierbare, durch Aktivität ausgelöste, retrosternale Schmerzen die sich in Ruhe zurückbilden und Troponin negativ bleiben. Instabile Angina pectoris ist definiert als Troponin positive, retrosternale Schmerzen, die bereits in Ruhe bestanden. In-Stent-Restenose ist definiert als bereits zu einem früheren Zeitpunkt mittels eines Stents behandelte Angina pectoris, die aufgrund einer wiederholten Stenose innerhalb des Stents zu pectanginösen Beschwerden führt.

Das gewonnene Gewebe wurde mit 4 % PFA fixiert, in Tissue Tek OCT Einfriermedium (Miles Laboratories) eingebettet, und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  schockgefroren. Mittels eines Mikrotoms (Leica Cryostat CM 1900) wurden von jeder Gewebeprobe mehrere 7  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern (Sigma Aldrich) zur weiteren Immunhistochemie verbracht. Die anschließende immunhistochemische Untersuchung ist unter Immunhistochemie beschrieben.

	Anzahl	Alter	Geschlecht	vaskuläre Risikofaktoren				
				HL	Raucher	FR	AH	DM
stabile Angina pectoris	6	$71 \pm 10$	5 m / 1 w	4 / 6	2 / 6	2 / 6	3 / 6	1 / 6
instabiler Angina pectoris	6	$61 \pm 14$	4 m / 2 w	4 / 6	3 / 6	0 / 6	5 / 6	0 / 6
In-Stent-Restenosen	6	$59 \pm 12$	5 m / 1 w	0 / 6	4 / 6	3 / 6	3 / 6	2 / 6

Tabelle 6: Daten der untersuchten Patienten: HL = Hyperlipidämie, FR = familiäre Risikofaktoren, AH = arterielle Hypertonie, DM = Diabetes mellitus

#### **4.2.4. Humanes Ischämiemodell**

Ziel des humanen Ischämiemodells war es, die Verteilung der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen vor, 10 min und 120 min nach Ischämie zu bestimmen. Hierzu wurde an gesunden menschlichen Freiwilligen (n = 5, Alter  $28 \pm 5$  Jahre, 3 Männer, 2 Frauen) durch 10 minütige venöse Stauung mit einer Blutdruckmanschette 20 mmHg über dem diastolischen Blutdruck, so dass der radiale arterielle Puls noch schwach tastbar war, eine Armischämie induziert. Den Probanden wurde vor der induzierten Ischämie am zu stauenden Arm 60 ml peripher venöses Blut in Citrat Röhrchen (Sarstedt) über eine Venenverweilkanüle (Johnson & Johnson Medical) entnommen und als Ausgangswert verwendet. Nach Ablauf der 10 minütigen Stauung wurde die Blutdruckmanschette geöffnet und den Probanden wurden weitere 60 ml peripher venöses Blut des gestauten Armes in Citrat Röhrchen entnommen und als 10 min Wert verwendet. 120 min nach Entlastung der Stauung wurde den Probanden erneut 60 ml peripher venöses Blut des gleichen Armes in Citrat Röhrchen entnommen und als 120 min Wert verwendet. Die Venenverweilkanüle wurde für die Zeit vom Ausgangswert bis zum 120 min Zeitpunkt am Arm belassen. Die Blutproben wurden unmittelbar nach Abnahme zur weiteren Isolation der CD 133+ EPC Subpopulationen sowie zur fluoreszenzaktivierten Zellsortieranalyse weiterverarbeitet. Alle Blutentnahmen an gesunden menschlichen Freiwilligen wurden mit dem schriftlichen Einverständnis der Probanden sowie im Rahmen institutioneller Richtlinien und ethischer Anträge durchgeführt.

#### **4.2.5. Xenotransplantationsmodell**

Um die biologische Relevanz von CD 34+ EPC und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen *in vivo* zu vergleichen, wurden drei Gruppen von immunsupprimierten Nacktmäusen mit einseitiger artifiziell induzierter Carotis externa Läsion mit fluoreszenzmarkierten CD 34+, CD 34- / CD 133+ EPC oder NaCl als Kontrolle transplantiert.

Die CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen wurden wie oben beschrieben isoliert. Zur Markierung wurden die isolierten CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC mit PKH 26 rot fluoreszierendem Zellkopplungskit (Sigma Aldrich) entsprechend der Produkthanleitung gefärbt. Hierzu wurden die isolierten EPC nach Zählung in einer Neubauerzählkammer jeweils zu gleichen Zellzahlen ( $1 \times 10^5$  Zellen) in 1000 µl Collumpuffer (4 °C) resuspendiert, danach für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse zentrifugiert und der Überstand

verworfen. Anschließend wurde jedes Pellet mit 1000 µl einer 1:250 verdünnten Lösung von Diluent C (Sigma Aldrich) resuspendiert und für 5 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zum Abbrechen der Reaktion wurden beide Zellsuspensionen mit 6 ml einer 1:3 verdünnten Lösung von FKS in EBM aufgefüllt, anschließend für 10 min bei 1500 rpm und 22 °C mit Bremse zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Zellen zu waschen wurde jedes Pellet wiederum mit 10 ml PBS ohne Ca<sup>2+</sup> (22 °C) resuspendiert und für 10 min bei 1500 rpm und 22 °C mit Bremse zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die folgende Transplantation wurden die CD 34+ und CD34- / CD 133+ EPC Pellets jeweils in 0,5 ml 0.9 % NaCl (B. Braun) resuspendiert. Die Carotis externa Läsionen wurden wie zuvor durch Werner et al. 2002 beschrieben durchgeführt und werden unter Carotis-Injury-Modell näher erläutert. Nach Induktion der arteriellen Läsion wurden zwei der drei Nacktmausgruppen (Charles River Laboratories), die in 0,5 ml 0.9 % NaCl resuspendierten, 1x 10<sup>5</sup> CD 34+ oder CD34- / CD 133+ EPC über die Schwanzvene transplantiert. Der dritten der drei Nacktmausgruppen wurde als Kontrolle lediglich 0,5 ml 0.9 % NaCl in die Schwanzvene injiziert. Alle Tierversuche wurden im Rahmen institutioneller Richtlinien und ethischer Anträge durchgeführt.

#### **4.2.6. Carotis-Injury-Modell**

Die einseitigen Carotis externa Läsionen wurden wie zuvor durch Werner et al. 2002 beschrieben durchgeführt und sind im Folgenden kurz erläutert. Die Mäuse wurden mit 150 mg / kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Pharmacia) und 0,1 mg / kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun 2 %, Bayer) anästhesiert. Unter Verwendung eines Sektionsmikroskopes (MZ6, Leica) wurde über eine Mittellinieninzision an der ventralen Halsseite die Bifurkation der linken Arteria carotis communis freigelegt. Zwei Ligaturen wurden distal und proximal der Arteria carotis externa angelegt. Zwischen den beiden Ligaturen der Arteria carotis externa wurde eine transverse Arteriotomie durchgeführt. Es wurde ein flexibler an der Spitze leicht gebogener (30°) Draht (0.13 mm im Durchmesser), der das Gefäß komplett ausfüllt, eingeführt. Der Draht wurde innerhalb des Gefäßes dreimal rotiert. Nach Entfernung des Drahtes wurde die proximale und distale Ligatur der Arteria carotis externa gelöst. Nach Wiederherstellung des Blutflusses wurde die Haut mit einem 6/0 Faden vernäht. Unmittelbar danach wurde den Mäusen, wie oben beschrieben, CD 34+ oder CD 34- / CD 133+ EPC oder nur NaCl als Kontrolle transplantiert.

Vierzehn Tage nach Induktion der Carotis externa Läsion und EPC Transplantation wurden die Carotiden entnommen. Unter wie oben beschriebener Anästhesie der Mäuse wurden nach Perfusionsfixation mit 4 % PFA die Carotiden entnommen, in Tissue Tek OCT Einfriermedium eingebettet, und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  schockgefroren. Mittels eines Mikrotoms (Leica Cryostat CM 1900) wurden von jeder Carotide mehrere  $7\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern zur weiteren Immunhistochemie und morphometrischen Untersuchung verbracht. Zur Bestimmung der Läsionsgrößen wurden die Schnitte mit Hämatoxylin / Eosin gefärbt. Hierzu wurden die noch feuchten Schnitte mit einem Tropfen Hämatoxylin bedeckt und für 8 min bei  $22^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zum Waschen wurden die Schnitte für 15 min in einer mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette fließend gespült. Anschließend wurden die noch feuchten Schnitte mit einem Tropfen Eosin bedeckt und für 20 sec bei ( $22^{\circ}\text{C}$ ) inkubiert und wiederholt in einer mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger mit jeweils einem Tropfen fluoreszierendem Eindeckmedium (Dako Corporation) versehen, und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurde ein Nikon TS 100 Mikroskop (10x Vergrößerung) sowie das Programm Lucia 4.6 verwendet. Durch Vermessung der Lamina elastica interna und Lamina elastica externa konnten die neointimale Fläche und der Lumenumfang berechnet werden. Insgesamt wurden pro Maus und Carotide 25 unterschiedliche Sektionen ausgemessen.

#### **4.2.7. Angiogenesediskusmodell**

Um das angiogenetische Potential von CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen *in vivo* zu vergleichen, wurden immunsupprimierten Nacktmäusen mit artifiziell induzierten Carotis externa Läsionen Angiogenesekissen implantiert. Im Anschluss wurde den Nacktmäusen CD 34+ oder CD 34- / CD 133+ EPC oder nur NaCl als Isotypenkontrolle transplantiert. Nach 14 Tagen wurde die Neoangiogenese innerhalb der Kissen untersucht.

Das Angiogenesediskusmodell wurde wie zuvor durch Laufs et al. 2004 beschrieben durchgeführt und ist im Folgenden kurz erläutert. Den Nacktmäusen (Charles River Laboratories) wurden subkutan Diskusse aus Polyvinylalkohol-Schwämmchen (Rippey) implantiert. Diese waren mit zellimpermeablen Nitrozellulosefiltern (Millipore) bedeckt, so dass kapilläres Wachstum nur durch die Seiten des Diskus möglich war. Zum Einheilen wurde der Diskus 10 Tage vor Induktion der arteriellen Carotisläsion und der unmittelbar

darauf folgenden EPC Transplantation subkutan implantiert. 14 Tage nach Induktion der Carotisläsion und EPC Transplantation wurden fluoreszierende Mikrosphären mit 0,2 µm Durchmesser (Molecular Probes) in den linken Ventrikel injiziert. Damit sollte eine gleichmäßige Verteilung der Mikrosphären in der Mikrozirkulation erreicht werden. Aufgrund des geringen Durchmessers der Mikrosphären ließen sich speziell Kapillaren fluoreszenzmikroskopisch darstellen. Anschließend wurden die Kissen explantiert und zur Bestimmung der Neoangiogenesefläche mit einem Nikon E 600 Mikroskop (10x Vergrößerung) aufgenommen und mit dem Programm Lucia 4.6 vermessen.

#### **4.2.8. Fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse**

##### **4.2.8.1. Grundprinzip der fluoreszenzaktivierten Zellsortieranalyse**

Das Grundprinzip der fluoreszenzaktivierten Zellsortieranalyse ist die Messung von abstrahlendem Licht und spezifischer Fluoreszenzen großer Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit. Dabei werden Zellen mittels Laser mit spezifischer Wellenlänge bestrahlt. Das Licht strahlt durch die Zellen hindurch (als forward scatter bezeichnet) oder wird von ihnen reflektiert (als side scatter bezeichnet) und wird über Photodetektoren gemessen. Dadurch werden einzelne Zellen registriert und können quantifiziert werden. Meist sind die Zellen zusätzlich mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die an die Wellenlänge des Lasers angepasst sind. Das von den spezifischen Fluoreszenzen emittierte Licht wird von wellenlängenspezifischen Lichtfiltern resorbiert und in elektrische Signale umgewandelt. All diese Daten werden durch einen Computer verrechnet und durch ein Punkteschema auf dem Bildschirm sichtbar gemacht. Anhand des Punkteschemas lassen sich unterschiedliche Zellpopulationen und mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern markierte Zellen identifizieren und quantifizieren.

##### **4.2.8.2. Reinheitsbestimmung mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortieranalyse**

Die Reinheitsbestimmung wurde mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortieranalyse (FACS) durchgeführt. In diesem Fall wurden die Zellen mit vier spezifischen Antikörpern und entsprechenden fluoreszierenden Farbstoffen (FLK / KDR / VEGFR-2 SAV-PERCP, CD 34 APC, CD 133/2 PE und CD 14 FITC) markiert. Die Antikörper CD 34 APC, CD 133/2 PE und CD 14 FITC sind alle direkt an ihre Fluoreszenz gekoppelt und wurden in einem gemeinsamen Schritt appliziert. Lediglich der Antikörper FLK / KDR / VEGFR-2 Ab-, ein

polyklonaler Kaninchen IgG Antikörper, wurde über einen sekundären Antikörper (biotinylierter polyklonaler anti-Kaninchen-Ig Antikörper) und einen tertiären Antikörper (Streptavidin-Peridinin Chlorophyll-a Protein (PERCP) Konjugat), der an den sekundären Antikörper bindet, an seine Fluoreszenz gekoppelt. Aus diesem Grund wurde jeder Antikörper in drei Einzelschritten appliziert. Die Isotypenkontrollen wurden mit den verwendeten Fluoreszenzen (PERCP, APC, PE und FITC) entsprechenden, nicht spezifisch bindenden Antikörpern versehen, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Zur Vorbereitung wurde die wie oben beschrieben isolierte CD 133+ EPC Subpopulation für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse zentrifugiert, die Überstände verworfen und das Pellet in 200 µl FACS Puffer (4 °C) resuspendiert. Die Suspension von CD 133+ EPC wurde auf zwei FACS Röhrchen (BD) zu 100 µl aufgeteilt, wovon jeweils eine als Isotypenkontrolle verwendet wurde. Um vor der spezifischen Antikörperzugabe unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden alle Zellsuspensionen mit jeweils 20 µl humanem Serum für 10 min auf Eis geblockt. In den ersten drei von vier Antikörperschritten wurde der primäre Antikörper (FLK / KDR / VEGFR-2 (Dianova)) gefolgt vom sekundären Antikörper (biotin-konjugierter anti- Kaninchen-Ig spezifischer polyklonaler Antikörper (Pharmingen)) und tertiären Antikörper (SAV-PERCP (Pharmingen)) an die Zellen gebunden. Im vierten von vier Antikörperschritten wurden die bereits fluoreszenz-gekoppelten Antikörper CD 34 APC (Pharmingen), CD 133/2 PE (Miltenyi Biotec) und CD 14 FITC (Pharmingen) an die Zellen gebunden. Die Isotypenkontrollen wurden entsprechend mit den nicht spezifisch bindenden Antikörpern APC (Pharmingen), PE (Pharmingen), FITC (Pharmingen) und (SAV-PERCP) (Pharmingen) versehen. Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen in 100 µl Zellsuspension eingesetzt. Die Zellsuspension wurde dabei mit den Antikörpern resuspendiert und anschließend auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Die Konzentrationen der verschiedenen Antikörper und Inkubationszeiten sind Tabelle 7 auf der folgenden Seite zu entnehmen.

Antikörper	Konzentration / 100 µl	Inkubationszeit
FLK / KDR / VEGFR-2	1 µl	30 min
Biotin-konjugiertes anti-Kaninchen-Ig	20 µl	30 min
SAV-PERCP	0,5 µl	30 min
CD 14 FITC	4 µl	30 min
CD 34 APC	10 µl	30 min
CD 133/2 PE	12 µl	30 min
FITC	4 µl	30 min
APC	10 µl	30 min
PE	12 µl	30 min

Tabelle 7: Konzentrationen und Inkubationszeiten der verwendeten Antikörper

Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Zellsuspensionen durch Zugabe von jeweils 3 ml FACS Puffer und Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse sowie Verwerfen der Überstände gewaschen. Hierdurch sollten überschüssige und nicht bindende Antikörper aus der Zellsuspension gespült werden. Vor jedem weiteren Antikörperschritt wurden die Zellsuspensionen resuspendiert und unter Lichtausschluss für 10 min auf Eis mit 20 µl humanem Serum geblockt. Abschließend wurden die Suspensionen, wie im ersten Schritt beschrieben, gewaschen. Im Anschluss wurden alle Proben am FACS Gerät mit routinemäßigen Reinheiten von über 96% gemessen. Einzel- und mehrfach gefärbte FACS Analysen wurden mittels eines FACS Gerätes mit Argonionlaser der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Die gemessenen Daten wurden mittels Cellquest Pro Software™ aufgearbeitet.

#### **4.2.8.3. Fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse von EPC Subpopulationen in Kultur**

Die Untersuchung der CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen nach 24 h bzw. 4 d in Kultur wurde mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortieranalyse (FACS) durchgeführt. Die Untersuchung wurde analog zur oben beschriebenen Reinheitsbestimmung (siehe 4.2.8.2.) durchgeführt. In diesem Fall wurden jedoch die CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC nicht in Isotypenkontrollen aufgeteilt, sondern jeweils in 100 µl FACS Puffer (4 °C) resuspendiert und in ein FACS Röhrchen gegeben. Als Isotypenkontrolle wurden die CD 34- / CD 133- EPC verwendet, die ebenfalls in 100 µl FACS Puffer (4 °C) resuspendiert und in



ein FACS Röhrchen gegeben wurden. Alle weiteren Schritte wurden wie unter Reinheitsbestimmung (siehe 4.2.8.2.) beschrieben durchgeführt. Lediglich wurden statt 4 µl des Antikörpers CD 14 FITC, 4 µl des Antikörpers CD 31 FITC (Pharmingen) verwendet.

#### **4.2.8.4. Fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse von EPC Subpopulationen nach Ischämie**

Die Untersuchung der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen vor, 10 min nach und 120 min nach Ischämie wurde mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortieranalyse (FACS) durchgeführt. Die Untersuchung wurde analog zur oben beschriebenen Reinheitsbestimmung (siehe 4.2.8.2.) durchgeführt. In diesem Fall wurden jedoch statt 4 µl des Antikörpers CD 14 FITC, 4 µl des Antikörpers CXCR4 FITC (R&D Systems) verwendet.

#### **4.2.9. Immunhistochemie**

##### **4.2.9.1. Grundprinzip der Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie wurde benutzt um spezifische Zellen (z.B. CD 133+ EPC, CD 34+ EPC oder *Ulex europaeus* Lektin+, Dil-Ac-LDL+, CD 31+ Endothelzellen) anzufärben und dadurch innerhalb eines Gewebeschnittes bzw. innerhalb einer Zellkultur zu identifizieren. Dazu wurden verschiedene spezifische Antikörper benutzt, welche definierte Antigene an der Oberfläche oder im Inneren der Zielzellen binden. Einige spezifische Antikörper waren direkt an eine Fluoreszenz (FITC, PE) gekoppelt. Andere antigen-spezifische Primärantikörper wurden über Sekundärantikörper, die gegen den Primärantikörper gerichtet waren, und mittels Fluoreszenzfarbstoff (FITC) markierten Tertiärantikörpern, die gegen den Sekundärantikörper gerichtet waren, detektiert. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes konnten die angefärbten Zellen anschließend sichtbar gemacht werden.

#### 4.2.9.2. Immunhistochemie humaner EPC Subpopulationen in Kultur

Nach 24 h bzw. 4 d in Kultur wurden die Zellkulturplättchen der entsprechenden Bedingungen CD 34+ EPC bzw. CD 34- / CD 133+ EPC auf das Vorhandensein von *Ulex europaeus* Lektin-bindende und Dil-Ac-LDL-aufnehmende Endothelzellen untersucht. Um spätere Interaktionen mit den spezifischen Antikörpern zu vermeiden wurden die Löcher mit den Zellkulturplättchen entsprechend den Bedingungen CD 34+ bzw. CD 34- / CD 133+ Zellen zunächst abpipettiert und danach zweimal mit 1000 µl PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  (37 °C) gewaschen und wiederholt abpipettiert. Zur Färbung mit Dil-Ac-LDL (Harbor Bio-Products) wurden pro Loch 300 µl einer im Verhältnis 1:60 PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  (37 °C) verdünnten Dil-Ac-LDL Lösung hinzugegeben und für 1 h im Inkubator bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Für die spätere Konservierung wurden die Zellen fixiert. Hierzu wurden die Löcher einmal mit 1000 µl PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  (37 °C) gewaschen und abgesaugt um überschüssige Antikörper, die nicht an Antigene gebunden hatten, aus den Löchern zu entfernen. Zur Fixierung wurden die Löcher mit 300 µl einer 2 % PFA-Lösung für 10 min im Inkubator bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert und anschließend abgesaugt. Für die Färbung mit FITC- markiertem *Ulex europaeus* Lektin (Sigma Aldrich) wurden pro Loch 300 µl einer 1:100 PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  (37 °C) verdünnten FITC- markierten *Ulex europaeus* Lektin Lösung hinzugegeben und für 1 h im Inkubator bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Schließlich wurden die Zellkulturplättchen nach Waschen mit 1000 µl PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  (37 °C) auf reguläre Objektträger verbracht. Abschließend wurden die Zellkulturplättchen auf den Objektträgern mit jeweils einem Tropfen DAPI (Vector Laboratories) und fluoreszierendem Eindeckmedium (Dako Corporation) versehen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. DAPI ist eine Substanz, welche die komplette DNA anfärbt und somit den gesamten Zellkern sichtbar werden lässt. Um im Vergleich unspezifische Bindungen auszuschließen wurden als Isotypenkontrollen unter gleichen Bedingungen die unspezifischen Antikörper PE (Pharmingen) und FITC (Pharmingen) verwendet. Hierzu wurden als Kontrollgruppe die CD 34- / CD 133- Zellen gefärbt. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ist unter Fluoreszenzmikroskopie (siehe 4.2.9.5.1.) beschrieben.

#### **4.2.9.3. Immunhistochemie humaner koronarer Atherektomien**

Humane koronare Atherektomieschnitte wurden auf das Vorhandensein von CD 34- / CD 133+ EPC und CD 34+ / CD 133+ EPC untersucht. Für die spätere Konservierung wurden die Schnitte zunächst fixiert. Hierzu wurden die Objektträger mit den Schnitten in eine mit 4% PFA Lösung gefüllten Küvette für 5 min eingetaucht. Um überschüssiges PFA zu entfernen und um spätere Interaktionen mit den spezifischen Antikörpern zu vermeiden, wurden die Objektträger zweimal in mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  gefüllten Küvetten durch Eintauchen gewaschen. Im Folgenden wurden die Schnitte durch Eintauchen der Objektträger für 10 min in einer mit Blocklösung (5% BSA in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ) gefüllten Küvette inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungen der Antikörper abgepuffert. Nach diesem Schritt konnten die spezifischen Antikörper CD 34 FITC (Pharmingen) und CD 133/2 PE (Miltenyi Biotec) eingesetzt werden. Diese wurden jeweils in einer Konzentration von 1:100 in 300  $\mu\text{l}$  Blocklösung pro Objektträger verwendet. Die Objektträger wurden vollständig mit der Antikörperlösung bedeckt und anschließend unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer bei 22 °C für 3 h inkubiert. Um die überschüssigen Antikörper, die nicht an Antigene gebunden hatten, aus den Gewebeschnitten zu entfernen wurden die Schnitte wiederholt gewaschen. Dazu wurden die Objektträger dreimal in jeweils einer mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  gefüllten Küvette für 5 min durch Eintauchen gewaschen und anschließend kurz in eine mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette getaucht. Abschließend wurden die Objektträger mit jeweils einem Tropfen DAPI und fluoreszierendem Eindeckmedium versehen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Als Isotypenkontrolle wurden unter gleichen Bedingungen die unspezifischen Antikörper PE und FITC verwendet. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ist unter Fluoreszenzmikroskopie (siehe 4.2.9.5.2.) beschrieben.

#### 4.2.9.4. Immunhistochemie entnommener Nacktmauscarotiden

Nacktmauscarotidenschnitte wurden auf das Vorhandensein von transplantierten PKH 26 rot+ EPC und CD 31+ Endothelzellen untersucht. Für die spätere Konservierung wurden die Schnitte zunächst fixiert. Hierzu wurden die Objektträger mit den Schnitten in eine mit 95% Ethanollösung gefüllte Küvette für 5 min eingetaucht. Um überschüssiges Ethanol zu entfernen und um spätere Interaktionen mit den spezifischen Antikörpern zu vermeiden, wurden die Objektträger jeweils einmal in einer mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  gefüllten Küvette und einer mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette durch Eintauchen gewaschen. Zusätzlich wurden die Objektträger noch für weitere 20 min in einer Küvette mit Waschpuffer inkubiert. Zum Blocken wurden die Objektträger mit jeweils 300  $\mu\text{l}$  einer Blocklösung (1% Ziegsenrum (Invitrogen) in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ) vollständig bedeckt und anschließend in einer feuchten Kammer bei 22 °C für 30 min inkubiert. Diese Blocklösung sollte unspezifische Bindungen der Antikörper abpuffern. Nach diesem Schritt wurde der primäre Antikörper (CD 31 PECAM-1 (Pharmingen)) gefolgt vom sekundären Antikörper (biotinkonjugierter anti-Ratte-Ig spezifischer polyklonaler Antikörper (Pharmingen)) und tertiären Antikörper (SAV-FITC-Konjugat (Pharmingen)) eingesetzt. Diese wurden in verschiedenen Konzentrationen in 300  $\mu\text{l}$  Blocklösung pro Objektträger eingesetzt. Die Objektträger wurden vollständig mit der Antikörperlösung bedeckt und anschließend in einer feuchten Kammer bei 22 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Konzentrationen der verschiedenen Antikörper und Inkubationszeiten sind Tabelle 8 zu entnehmen.

<u>Antikörper</u>	Verdünnung	Inkubationszeit
Primärantikörper:		
CD 31 PECAM-1	1:100	1 h
Sekundärantikörper:		
Biotin-konjugierter anti-Ratte-Ig	1:200	30 min
Tertiärantikörper:		
SAV-FITC-Konjugat	1 :100	30 min

Tabelle 8: Konzentrationen und Inkubationszeiten der verwendeten Antikörper.

Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Objektträger dreimal in jeweils einer mit Waschpuffer gefüllten Küvette für jeweils 5 min gewaschen. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurden die Objektträger in einer mit Leitungswasser gefüllten Küvette für 10 min gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger mit jeweils einem Tropfen DAPI und fluoreszierendem Eindeckmedium versehen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Als Isotypenkontrolle wurde unter gleichen Bedingungen der unspezifischen Antikörper SAV-FITC (Pharmingen) verwendet. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ist unter Fluoreszenzmikroskopie (siehe 4.2.9.5.3.) beschrieben

#### **4.2.9.5. Fluoreszenzmikroskopie**

Nachdem die Schnitte gefärbt wurden, wurden sie mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (Nikon E600) untersucht. Das Fluoreszenzmikroskop war mit Filtern ausgestattet, die jeweils durchlässig für abstrahlendes Licht von DAPI (blau), FITC (grün) und PE (rot) bzw. PKH 26 rot (rot) waren. Aufgenommen wurden die Schnitte mit einer Digitalkamera (Nikon DXM 1200F). Ausgewertet wurden die Schnitte mit dem Programm Lucia 4.6., das es erlaubt die einzelnen Fluoreszenzen übereinander zu projizieren. Somit können einfach-, doppelt- und dreifach-positive Zellen identifiziert werden.

##### **4.2.9.5.1. Fluoreszenzmikroskopie humaner EPC Subpopulationen in Kultur**

Bei den Zellkulturplättchen mit humanen EPC Subpopulationen nach 24 h bzw. 4 d in Kultur wurden für jede Bedingung (CD 34+ EPC bzw. CD 34- / CD 133+ EPC) jeweils n = 3 Zellkulturplättchen untersucht. Dabei wurden pro Zellkulturplättchen 6 unterschiedliche repräsentative hochauflösende Gesichtsfelder (hpf) ausgezählt. Hierzu wurden die einzelnen Gesichtsfelder zunächst einzeln mit dem jeweiligen Filter für DAPI (blau), FITC (grün) und Dil (rot) in 10 x bzw. 40 x Vergrößerung aufgenommen und wie oben beschrieben (siehe 4.2.9.5.) übereinander gelegt. Als positiv wurden nur Zellen ausgezählt bei denen die Fluoreszenzen DAPI, FITC und Dil übereinander lagen. Diese stellen sich dann in den Abbildungen weiß dar. Während Dil über LDL acetyliert in die Zelle aufgenommen wurde, markierte FITC das spezifische Antigen *Ulex europaeus* Lektin. DAPI erlaubte eine entsprechende Zuordnung zum Zellkern einer individuellen Zelle.

#### **4.2.9.5.2. Fluoreszenzmikroskopie humaner koronarer Atherektomien**

Bei den humanen koronaren Atherektomien wurden für jede Bedingung (stabile koronare Läsion, instabile koronare Läsion und In-Stent-Restenose) jeweils  $n = 6$  Atherektomien untersucht. Dabei wurden pro Atherektomie 30 unterschiedliche Sektionen ausgezählt. Hierzu wurden einzelne Sektionen der Schnitte zunächst einzeln mit dem jeweiligen Filter für DAPI, FITC und PE in 10 x bzw. 40 x Vergrößerung aufgenommen und wie oben beschrieben (siehe 4.2.9.5.) übereinander gelegt. Als positiv wurden nur Zellen ausgezählt bei denen entweder die Fluoreszenzen DAPI, FITC und PE, die sich in den Abbildungen weiß darstellen, oder nur DAPI und PE, die sich in den Abbildungen rosa darstellen, übereinander lagen. FITC und PE markierten dabei die spezifischen Antigene während DAPI eine entsprechende Zuordnung zum Zellkern einer individuellen Zelle erlaubte.

#### **4.2.9.5.3. Fluoreszenzmikroskopie entnommener Nacktmauscarotiden**

Bei den Nacktmauscarotiden wurden drei Gruppen (CD 34+ EPC, CD 34- / CD 133+ EPC und NaCl transplantierte Nacktmäuse) mit jeweils  $n = 5$  Mäusen pro Gruppe untersucht. Dabei wurden pro Maus von der Arteria carotis mit Läsion und contralateral von der Arteria carotis ohne Läsion 25 unterschiedliche Sektionen ausgezählt. Hierzu wurden die einzelnen Sektionen der Schnitte zunächst einzeln mit dem jeweiligen Filter für DAPI, FITC und PKH 26 rot in 10 x bzw. 40 x Vergrößerung aufgenommen und wie oben beschrieben (siehe 4.2.9.5.) übereinander gelegt. Als positiv wurden nur Zellen ausgezählt bei denen entweder die Fluoreszenzen DAPI, FITC und PKH 26 rot, die sich in den Abbildungen weiß darstellen, oder nur DAPI und FITC, die sich in den Abbildungen grün darstellen, übereinander lagen. FITC und PE markierten dabei die spezifischen Antigene während DAPI eine entsprechende Zuordnung zum Zellkern einer individuellen Zelle erlaubt.

Zur Quantifizierung der Reendothelialisierung wurden pro Tier jeweils von der Arteria carotis mit Läsion und contralateral von der Arteria carotis ohne Läsion in jeder Sektion die absolute Zahl CD 31+ Endothelzellen ausgezählt. Diese beiden Zahlen wurden zueinander in prozentuale Relation gestellt wobei die absolute Zahl CD 31+ Endothelzellen der gesunden Arteria carotis ohne Läsion als 100 % Referenzwert angenommen wurde. Zur Quantifizierung der PKH 26 rot+ / CD 31+ Zellen wurden pro Tier jeweils von der Arteria carotis mit Läsion in jeder Sektion die absolute Zahl der PKH 26 rot+ / CD 31+ Zellen und

die absolute Zahl CD 31+ Endothelzellen in der Sektion ausgezählt. Diese beiden Zahlen wurden zueinander in prozentuale Relation gestellt wobei die absolute Zahl CD 31+ Endothelzellen als 100 % Referenzwert angenommen wurde.

#### **4.2.10. Statische Adhäsionsversuche**

Um *in vitro* die Adhäsion von CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen vergleichen zu können wurden statische Adhäsionsversuche durchgeführt (n = 5). Zum einen wurde die Adhärenz der CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen unter An- bzw. Abwesenheit von rekombinanten humanem Stromazellwachstumsfaktor (Rh-SDF-1a), der mit Adhäsion und Migration zirkulierender Zellen assoziiert ist, untersucht. Zum anderen wurde die Adhärenz der CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen unter dem Einfluss von Rh-SDF-1a an mit Fibronectin beschichteten Oberflächen nach rigorosem Waschen untersucht. Die Adhärenz beider EPC Subpopulationen wurde miteinander verglichen.

Für die statischen Adhäsionsversuche wurden 96 Loch Platten (Greiner) mit jeweils 100 µl einer Fibronectinlösung (humanes Fibronectin (Sigma) und PBS mit Ca<sup>2+</sup> (22 °C) im Verhältnis 1:100) pro Loch beschichtet. Die 96 Lochplatten wurden für 30 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen wurden wie oben beschrieben isoliert. Anschließend wurden die isolierten CD 34+ und CD 34- / CD 133+ EPC nach Zählung in einer Neubauerzählkammer zu gleichen Zellzahlen (5x 10<sup>4</sup> Zellen) pro Bedingung CD 34+ bzw. CD34- / CD 133+ EPC (n = 5 pro Bedingung) aufgeteilt und jeweils in 200 µl RPMI / Hungermedium (37°) (Invitrogen) resuspendiert. Nach Absaugen der Fibronectinlösung wurden jeweils 200 µl Zellsuspension pro Bedingung CD 34+ bzw. CD34- / CD 133+ EPC auf zwei Löcher zu 100 µl aufgeteilt. Es wurde auf zwei Löcher aufgeteilt um in ein Loch Rh-SDF-1a zugegeben und in das andere Loch kein Rh-SDF-1a zugegeben zu können. Somit konnte der Effekt von Rh-SDF-1a auf die Adhärabilität von EPC unter An- bzw. Abwesenheit von Rh-SDF-1a verglichen werden. Die Zellen wurden für 5 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert damit sie sich am Boden der Lochplatten absetzen konnten. Danach wurde jeweils pro Bedingung 10 µl (100 nM Endkonzentration) Rh-SDF-1a (R&D Systems) zugegeben bzw. nicht zugegeben und für weitere 10 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dreimaligem rigorosen Waschen der Löcher mit 200 µl PBS mit Ca<sup>2+</sup> (22°), Absaugen der Überstände, und

abschließenden Auffüllen mit jeweils 100 µl PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  (22°) wurden die adhärenen Zellen mit einem Nikon TS 100 Mikroskop lichtmikroskopisch ausgezählt.

#### **4.3. Statistik**

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test für verbundene und unverbundene Stichproben und dem Newmann-Keuls-Test als multipler Mittelwertvergleichstest, bei Erhalt signifikanter Ergebnisse, untersucht. Die Nullhypothese wurde für  $p < 0.05$  abgelehnt und das Ergebnis als signifikant angenommen. Die statistische Auswertung der Daten sowie die Erstellung der Säulendiagramme wurde mit der Software Microsoft® Excel 2002 durchgeführt.



## 5. Ergebnisse

### 5.1. CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC sind Vorläufer von CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC

Mit dem Ziel die heterogene Gruppe der EPC näher zu charakterisieren wurden CD 133+ Progenitorzellen aus peripher-venösem Blut gesunder freiwilliger Probanden mittels Dichtegradientenzentrifugation und magnetischer Beadauftrennung isoliert. Anschließend wurde die gewonnene CD 133+ Progenitorzellpopulation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf die Oberflächenmarker FLK / KDR / VEGFR-2, CD 34, CD 133 und CD 14 untersucht.

Wie in Abb. 2A (siehe Seite 50) ersichtlich ist, zeigte die FACS Analyse die Anwesenheit zweier Subpopulationen innerhalb der isolierten CD 133+ Progenitorzellpopulation ( $n = 10$ ). Es stellt sich eine größere CD 34+ / CD 133+ Subpopulation ( $1728 \pm 480$  der Zellen im Zielbereich) und eine kleinere CD 34- / CD 133+ Subpopulation ( $726 \pm 138$ ) dar. Beide dieser Subpopulationen exprimieren zu gleichen Anteilen den Oberflächenmarker VEGFR-2 ( $> 99 \%$ ) ohne jedoch den Monozyten- / Makrophagenoberflächenmarker CD 14 zu exprimieren. Zusammenfassend konnten eine CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ / CD 14- sowie eine CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ / CD 14- Progenitorzellpopulation identifiziert werden.

Um die weitere Differenzierung der identifizierten CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ sowie CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ Progenitorzellpopulationen zu untersuchen, wurden CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ und CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ Progenitorzellpopulationen wie unter Methoden beschrieben isoliert. Diese wurden anschließend für 24 h und 4 d unter endothel-spezifischen Bedingungen in Kultur genommen und sowohl qualitativ als auch quantitativ mittels FACS Analyse auf die Oberflächenmarker CD 34, CD 133, FLK / KDR / VEGFR-2 und CD 31 sowie immunhistochemisch auf die Bindung von *Ulex europaeus* Lektin und die Aufnahme von Dil-Ac-LDL untersucht. Dadurch konnten vergleichende Aussagen zu ihrer weiteren Differenzierung und ihrem replikativen Potential im Verlauf gemacht werden.

Nach Zellkultur der CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ und CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC für 4 d zeigte sich im Vergleich zu Beginn der Kultur (0 d) in der FACS Analyse innerhalb der CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ Subpopulation eine zunehmende Verminderung der Oberflächenexpression von CD 133, während die Oberflächenexpression von CD 34 und CD 31 erhöht wurde (n = 10). Dieses stellt sich in der FACS Analyse von Abb. 2B dar (siehe Seite 51). Diese Daten ordnen die CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC einem früheren Zeitpunkt entlang der endothelialen Differenzierung zu als die CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC.

Zusätzlich wurde unter den beschriebenen Kulturbedingungen immunhistochemisch die Aufnahme von endothelspezifischen Markern wie Dil-Ac-LDL und die Bindung von *Ulex europaeus* Lektin untersucht (n = 10). Bei den CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC konnte sowohl nach 24 h ( $8,7 \pm 2,7$ ) als auch nach 4 d ( $8 \pm 2$ ) eine signifikant (beide  $p < 0,001$ ) stärkere Zunahme der dreifach positiven Zellen festgestellt werden im Vergleich zu den CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC nach 24 h ( $0,5 \pm 0,4$ ) und nach 4 d ( $3,7 \pm 0,8$ ). Dies ist in den Abb. 2C und 2D zu sehen (siehe Seiten 52 und 53). Sehr deutlich zeigte sich dabei auch, dass bei den CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC bereits nach 24 h ( $8,7 \pm 2,7$ ) signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr Zellen dreifach positiv waren im Vergleich zu den CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC nach 24 h ( $0,5 \pm 0,4$ ). Diese Daten weisen darauf hin, dass die CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC ein höheres replikatives Potential haben sich in adulte endotheliale Zellen zu differenzieren als CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC. Die Zellkultur für 24 h bzw. 4 d konnte zeigen, dass die CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC einem früheren Zeitpunkt entlang der endothelialen Differenzierung zuzuordnen sind sowie ein höheres replikatives Potential haben sich in adulte endotheliale Zellen zu differenzieren als die CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC. Möglicherweise ist dies auf eine höhere adhäsive Kapazität der prämordialen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC zurückzuführen.

Aus diesem Grund wurden statische Adhäsionsversuche durchgeführt. Es wurde die Adhärenz der CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ und CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC unter An- bzw. Abwesenheit von Rh-SDF-1 $\alpha$  im Vergleich untersucht (n = 5). Wie in ABB. 2E zu sehen ist (siehe Seite 54) zeigten sowohl CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ ( $1859 \pm 212$ ) als auch CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC ( $929 \pm 165$ ) unter dem Einfluss von Rh SDF-1 $\alpha$  eine signifikant (beide  $p < 0,001$ ) vermehrte Adhärenz verglichen mit CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ ( $580 \pm 82$ ) und CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC ( $426 \pm 60$ ) ohne Einfluss

von R $\alpha$  SDF-1 $\alpha$ . Außerdem zeigte sich, dass CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC ( $1859 \pm 212$ ) unter dem Einfluss von R $\alpha$  SDF-1 $\alpha$  im Vergleich zu den CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC ( $929 \pm 165$ ) signifikant ( $p < 0,001$ ) vermehrt adhärten. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC unter dem Einfluss von R $\alpha$  SDF-1 $\alpha$  im Vergleich zu den CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC vermehrt adhärten. Deshalb könnte ihnen im Zusammenhang mit der vermehrten Differenzierung in Endothelzellen und der vermehrten Adhärenz eine wichtige Funktion innerhalb der endothelialen Regeneration, ausgehend von zirkulierenden EPC, zukommen.

Abbildung 2 ABCDE (auf den folgenden Seiten):

**CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC sind Vorläufer von CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC**

Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder Probanden ( $n = 10$ , Alter  $29 \pm 6$  Jahre, 6 Männer, 4 Frauen) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

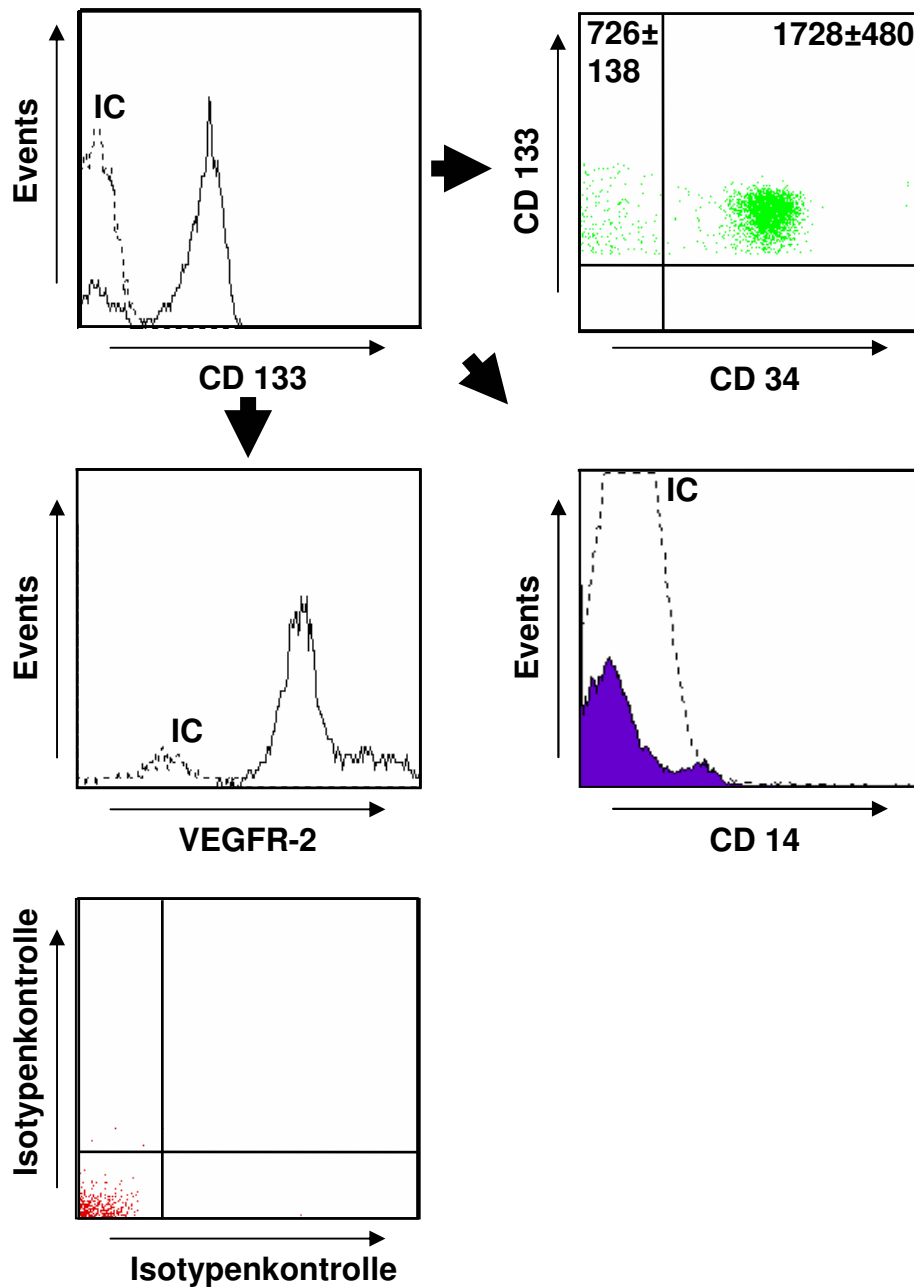


Abbildung 2 A:

### FACS Darstellung des Phänotyps frisch isolierter CD 133+ Zellen

CD 133+ Zellen wurden mit magnetischen Beads aufgereinigt und mit den angegebenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und entsprechenden Isotypenkontrollen (IC) zur FACS Analyse markiert.

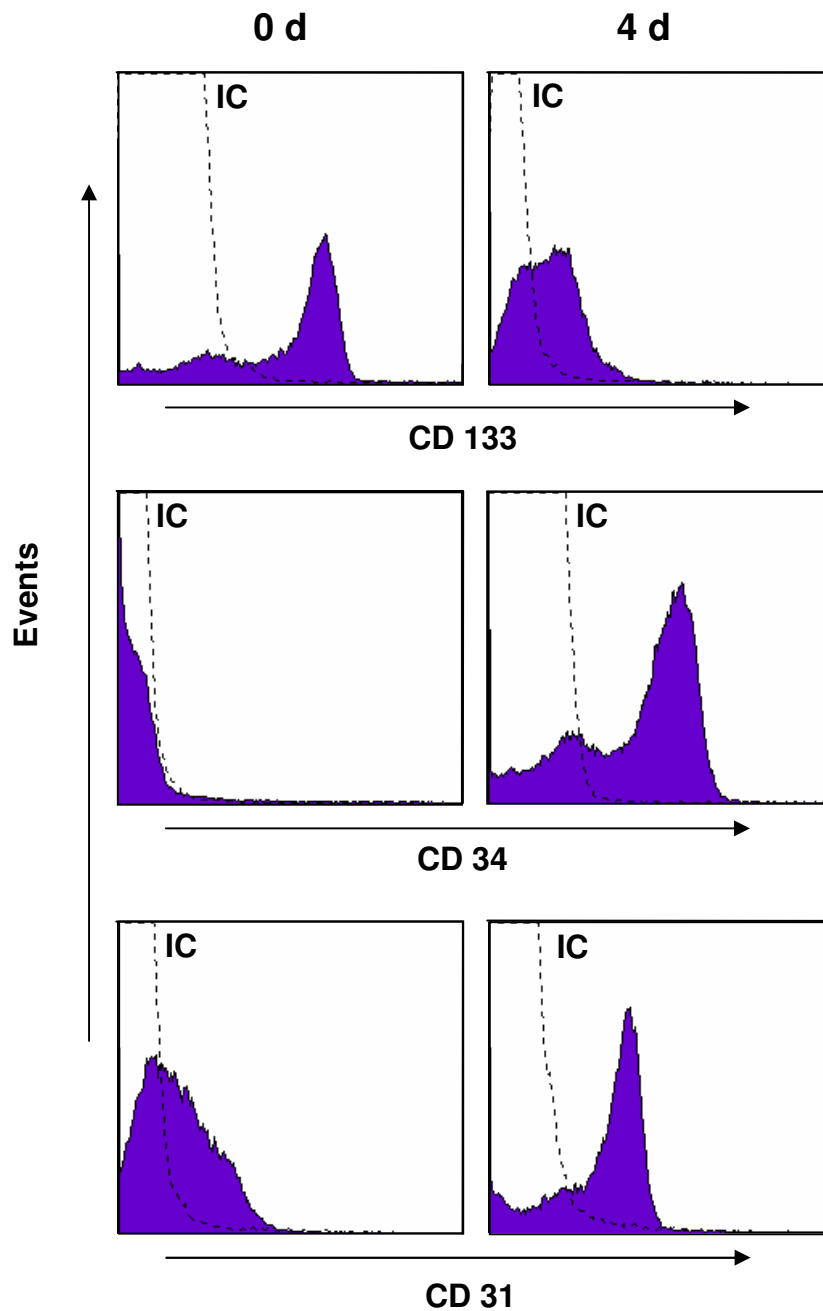


Abbildung 2 B:

**FACS Darstellung des Phänotyps isolierter CD 34- / CD 133+ Zellen zu Beginn der Kultur (0 d) und nach 4 d in Kultur**

CD 34- / CD 133+ Zellen wurden in einem 2-Schrittverfahren mittels magnetischer Beads aufgereinigt und unter Bedingungen, die die Endotheldifferenzierung fördern, in Kultur genommen. Zu den Zeitpunkten 0 d, 24 h und 4 d wurden die Zellen mit den angegebenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und entsprechenden Isotypenkontrollen (IC) zur FACS Analyse markiert.

(10 x) Dil-Ac-LDL / *U.E. Lektin* / DAPI übereinander gelegt

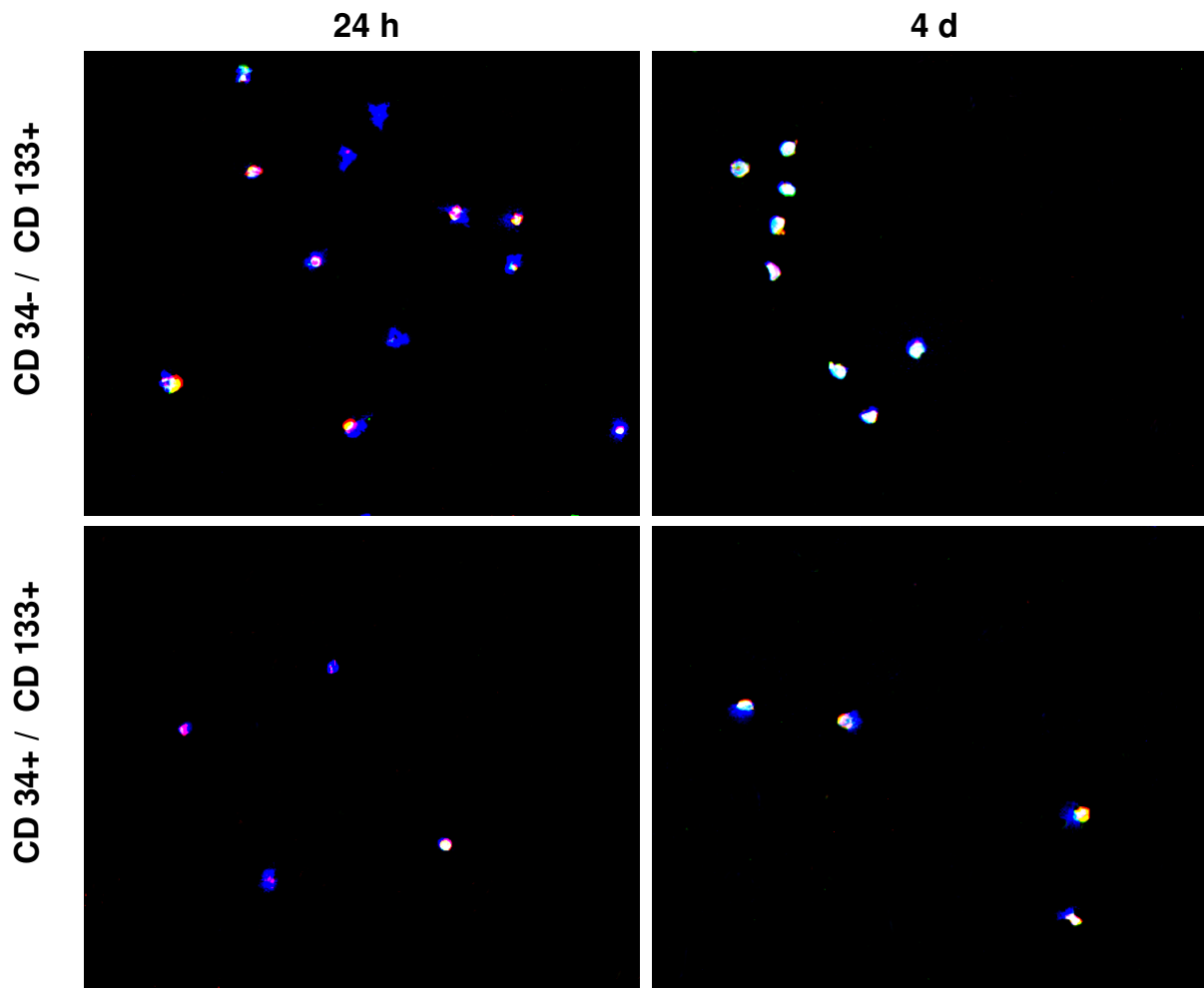


Abbildung 2 C:

**Immunhistochemische Darstellung Dil-Ac-LDL / *Ulex europaeus* Lektin / DAPI positiver CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen nach 24 h und 4 d in Kultur**

CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen wurden in einem 2-Schrittverfahren magnetisch Bead aufgereinigt und unter Endotheldifferenzierung fördernden Bedingungen in Kultur genommen. Zu den Zeitpunkten 24 h und 4 d wurden die Zellen, wie in den Methoden beschrieben, auf die Aufnahme von Dil-Ac-LDL und die Bindung von *Ulex europaeus* Lektin untersucht. Dil-Ac-LDL stellt sich hier rot, *Ulex europaeus* Lektin FITC grün und DAPI blau dar. Als Dil-Ac-LDL / *Ulex europaeus* Lektin positive Endothelzellen wurden nur Zellen ausgezählt bei denen die Fluoreszenzen DAPI, FITC und Dil (weiß dargestellt) übereinander lagen (10x Vergrößerung).

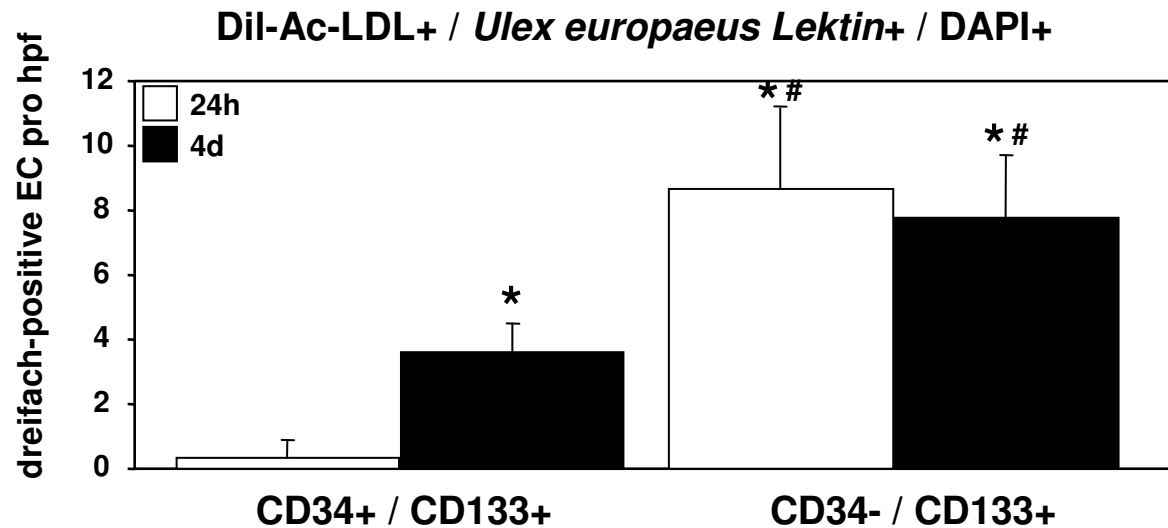


Abbildung 2 D:

**Mittelwert und Standardabweichung Dil-Ac-LDL / *Ulex europaeus* Lektin / DAPI positiver CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen nach 24 h und 4 d in Kultur**

CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen wurden in einem 2-Schrittverfahren mittels magnetischer Beads aufgereinigt und unter Endotheldifferenzierung fördernden Bedingungen in Kultur genommen. Zu den Zeitpunkten 24 h und 4 d wurden die Zellen, wie in den Methoden beschrieben, auf die Aufnahme von Dil-Ac-LDL und die Bindung von *Ulex europaeus* Lektin untersucht.

\*  $p < 0.05$  vs. CD 34+ / CD 133+ Zellen in Kultur für 24 h

#  $p < 0.05$  vs. CD 34+ / CD 133+ Zellen in Kultur für 4 d

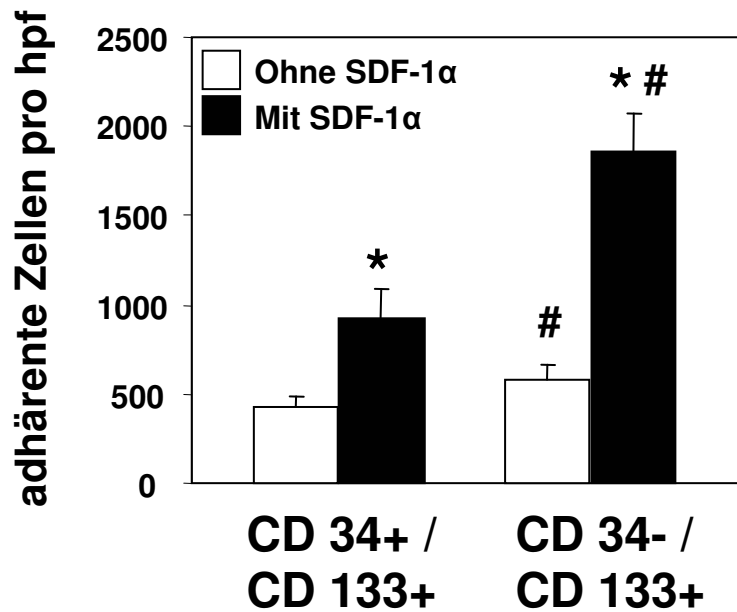


Abbildung 2 E:

**Mittelwert und Standardabweichung adhärenter CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen unter An- und Abwesenheit von Rh-SDF-1α**

Adhäsion von CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen auf mit Fibronektin beschichteten 96 Lochplatten in Anwesenheit von Rh SDF-1α (100 nmol/L) für 10 min oder kompletter Abwesenheit von Rh SDF-1α. Nach dreimaligem rigorosen Waschen mit PBS mit Ca<sup>2+</sup> wurden die Zellen lichtmikroskopisch (10 x) quantifiziert (n = 5).

\* p < 0.05 vs. ohne mit Rh SDF-1α stimulierte Zellen

# p < 0.05 vs. mit Rh SDF-1α stimulierte CD 34+ / CD 133+ Zellen



## 5.2. CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC werden bei Ischämie hochreguliert

Unter der Annahme, dass CD 34- / CD 133+ EPC eine wichtige Funktion innerhalb der endothelialen Regeneration zukommen könnte, wurde ihre Verteilung unter Bedingungen die einen endothelialen Schaden verursachen, wie z.B. einer Ischämie, *in vivo* untersucht. Um die Verteilungen von CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC unter ischämischen Bedingungen näher zu beschreiben, wurde gesunden freiwilligen Probanden eine Armsischämie wie unter Methoden beschrieben induziert. Anschließend wurde die Verteilung der EPC Subpopulationen vor, 10 min nach und 120 min nach Ischämie innerhalb des ischämischen Bezirkes mittels Dichtegradientenzentrifugation, magnetischer Bead Auftrennung und FACS Analyse bestimmt. Insbesondere wurde die quantitative Verteilung der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC im Vergleich sowie bezogen auf den Zeitpunkt vor und nach Ischämie untersucht. Zusätzlich wurde die Expression des SDF-1 $\alpha$  Rezeptors CXCR4- innerhalb der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen im Vergleich sowie bezogen auf den Zeitpunkt vor und nach Ischämie untersucht. Über die quantitative Verteilung der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC und Expression des für die Vaskulogenese mitverantwortlichen Rezeptors VEGFR-2 sowie des an Adhärenzprozessen beteiligten Rezeptors CXCR4 sollten Aussagen über mögliche funktionelle Eigenschaften der EPC Subpopulationen gemacht werden.

Die Untersuchung der quantitativen Verteilung der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC bezogen auf den Zeitpunkt vor und nach Ischämie (n = 5) erbrachte folgende Ergebnisse: Wie in der Abb. 3A (siehe Seite 58) zu sehen ist, zeigt sich einerseits, dass die Anzahl der CD 34+ / CD 133+ EPC bezogen auf den Zeitpunkt vor der Ischämie ( $1495 \pm 144$ ), 10 min nach Ischämie ( $1201 \pm 33$ ), und insbesondere 120 min nach Ischämie ( $1011 \pm 92$ ) innerhalb des ischämischen Bezirkes signifikant (10 min nach Ischämie  $p = 0,026$  und 120 min nach Ischämie  $p = 0,008$ ) abnimmt. Andererseits zeigt sich, dass die Anzahl der CD 34- / CD 133+ EPC bezogen auf den Zeitpunkt vor der Ischämie ( $660 \pm 53$ ), 10 min nach Ischämie ( $701 \pm 35$ ) gegenläufig, jedoch noch nicht signifikant, zunimmt. Zum Zeitpunkt 120 min nach Ischämie ( $1139 \pm 176$ ) zeigt sich jedoch innerhalb des ischämischen Bezirkes eine signifikante ( $p = 0,011$ ) Zunahme der Anzahl der CD 34- / CD 133+ EPC bezogen auf den Zeitpunkt vor der Ischämie ( $660 \pm 53$ ).

Die Untersuchung der quantitativen Verteilung der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC im Vergleich vor und nach Ischämie (n = 5) erbrachte folgende Ergebnisse: Es zeigt sich, dass sowohl zum Zeitpunkt vor der Ischämie signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr CD 34+ / CD 133+ ( $1495 \pm 144$ ) als CD 34- / CD 133+ EPC ( $660 \pm 53$ ) vorhanden sind, als auch zum Zeitpunkt 10 min nach Ischämie signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr CD 34+ / CD 133+ ( $1201 \pm 33$ ) als CD 34- / CD 133+ EPC ( $701 \pm 35$ ) vorhanden sind. Zum Zeitpunkt 120 min nach Ischämie bestehen jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den CD 34+ / CD 133+ ( $1011 \pm 93$ ) und den CD 34- / CD 133+ EPC ( $1139 \pm 176$ ).

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, dass vor Ischämie zwischen den CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ EPC signifikante quantitative Unterschiede bestehen. Unter ischämischen Bedingungen werden die CD 34- / CD 133+ EPC hochreguliert und die CD 34+ / CD 133+ EPC herabreguliert, so dass nach Ischämie nur noch geringe quantitative Unterschiede zwischen beiden EPC Subpopulationen bestehen. Diese Daten weisen auf einen höheren Umsatz von CD 34+ / CD 133+ EPC an ischämischen Orten und zugleich auf eine zunehmende Verschiebung von prä-mordialen CD 34- / CD 133+ EPC an ischämische Orte hin. Möglicherweise werden die reiferen CD 34+ / CD 133+ EPC direkt zur lokalen endothelialen Regeneration im ischämischen Bezirk inkorporiert während es gleichzeitig zu einer zentralen Mobilisation der früheren CD 34- / CD 133+ EPC aus dem Knochenmark an ischämische Orte kommt, um den entstandenen Verbrauch aufzufüllen. Um eine erhöhte Bereitschaft der untersuchten EPC zur Adhärenz und Vaskulogenese zu bestimmen, wurde zusätzlich die Expression des an Adhärenzprozessen beteiligten SDF-1 $\alpha$  Rezeptors CXCR4 sowie des für die Vaskulogenese mitverantwortlichen Rezeptors VEGFR-2 untersucht.

Die quantitative Untersuchung der VEGFR-2+ / CXCR4- sowie VEGFR-2+ / CXCR4+ Zellen innerhalb der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen im Vergleich bezogen auf den Zeitpunkt vor und nach Ischämie (n = 5) erbrachte folgende Ergebnisse: Bei der Untersuchung der VEGFR-2 Expression innerhalb der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen zeigte sich, dass CD 34+ / CD 133+ im Vergleich zu CD 34- / CD 133+ EPC durch eine höhere basale VEGFR-2 Expression gekennzeichnet sind und diese nach Ischämie herunterregulieren (vor Ischämie  $1458 \pm 143$ , 10 min nach Ischämie  $1165 \pm 31$  und 120 min nach Ischämie  $957 \pm 105$ ). Im Gegensatz hierzu steigt bei CD 34- / CD 133+ EPC die VEGFR-2 Expression nach Ischämie an (vor Ischämie  $178 \pm 3$ , 10 min nach Ischämie  $194 \pm 19$ , 120 min nach Ischämie  $356 \pm 92$ ). Bei der

Untersuchung der Expression des SDF-1a Rezeptors CXCR4 innerhalb der CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen konnte gezeigt werden, dass CD 34- / CD 133+ EPC durch eine höhere basale CXCR4 Expression im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ EPC gekennzeichnet sind und diese nach Ischämie hochregulieren (vor Ischämie  $41 \pm 24$ , 10 min nach Ischämie  $62 \pm 34$  und 120 min nach Ischämie  $91 \pm 48$ ). Im Gegensatz dazu weisen CD 34+ / CD 133+ EPC nur eine geringe CXCR4 Expression auf, die nach Ischämie unverändert bleibt (vor Ischämie  $4 \pm 3$ , 10 min nach Ischämie  $5 \pm 2$ , und 120 min nach Ischämie  $4 \pm 2$ ). Die entsprechenden Ergebnisse sind graphisch in Abb. 3B dargestellt (siehe Seite 59).

Abschließend weisen die gewonnen Daten beider Populationen durch ihre hohe Expression des VEGFR-2 Rezeptors auf ein verstärktes vasoregeneratives Potential hin, das möglicherweise durch ischämische Bedingungen ausgelöst wird. Die Abnahme der CD 34+ / CD 133+ EPC nach Ischämie sowie die verminderte Expression des VEGFR-2 Rezeptors nach Ischämie ist mit einem höheren Umsatz von CD 34+ / CD 133+ EPC an ischämischen Orten vereinbar. Gleichzeitig bestätigt die Zunahme der CD 34- / CD 133+ EPC sowie die erhöhte Expression des CXCR4 Rezeptors nach Ischämie die Annahme einer Hochregulation der früheren CD 34- / CD 133+ EPC an ischämischen Orten mit einem hohen CXCR4 vermittelten Adhärenzpotential, um den entstandenen Verbrauch aufzufüllen sowie noch bestehende Läsionen zu regenerieren.

Abbildung 3 AB:

### CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC werden bei Ischämie hochreguliert

An gesunden freiwilligen Probanden ( $n = 5$ , Alter  $28 \pm 5$  Jahre, 3 Männer, 2 Frauen) wurde eine Armischämie, wie unter Methoden beschrieben, induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 60 ml peripher venöses Blut aus dem ischämischen Bezirk entnommen und mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. CD 133+ Zellen wurden mit magnetischen Beads aufgereinigt und mit den angegebenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und entsprechenden Isotypenkontrollen zur FACS Analyse markiert.

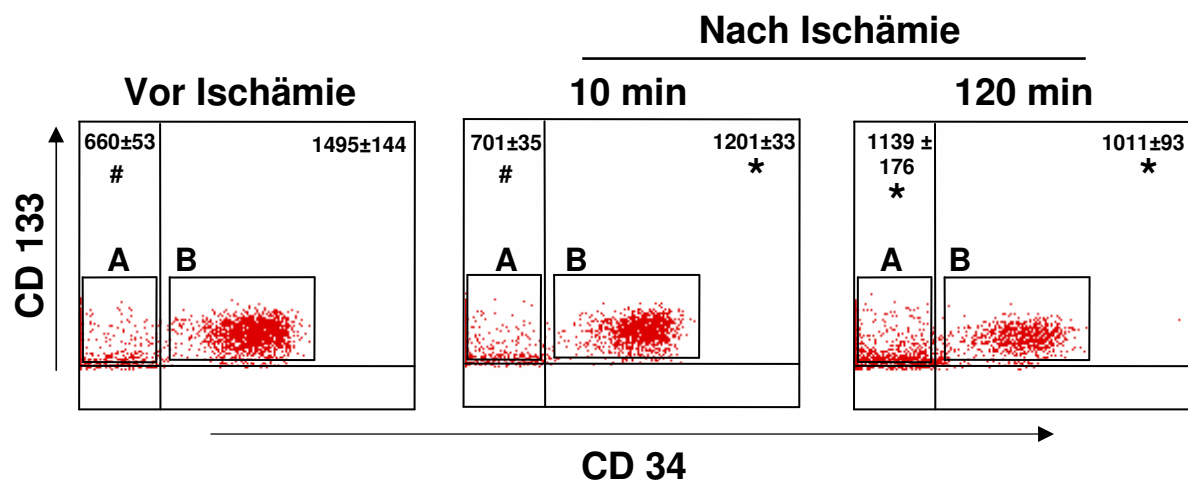


Abbildung 3 A:

### FACS Darstellung der Verteilung CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen vor, 10 min nach und 120 min nach Ischämie

A entspricht CD 34- / CD 133+ Zellen

B entspricht CD 34+ / CD 133+ Zellen

\*  $p < 0.05$  vs. vor Ischämie von CD 34- / CD 133+ oder CD 34+ / CD 133+ Zellen

#  $p < 0.05$  vs. CD 34+ / CD 133+ Zellen zum Zeitpunkt vor Ischämie und 10 min nach Ischämie

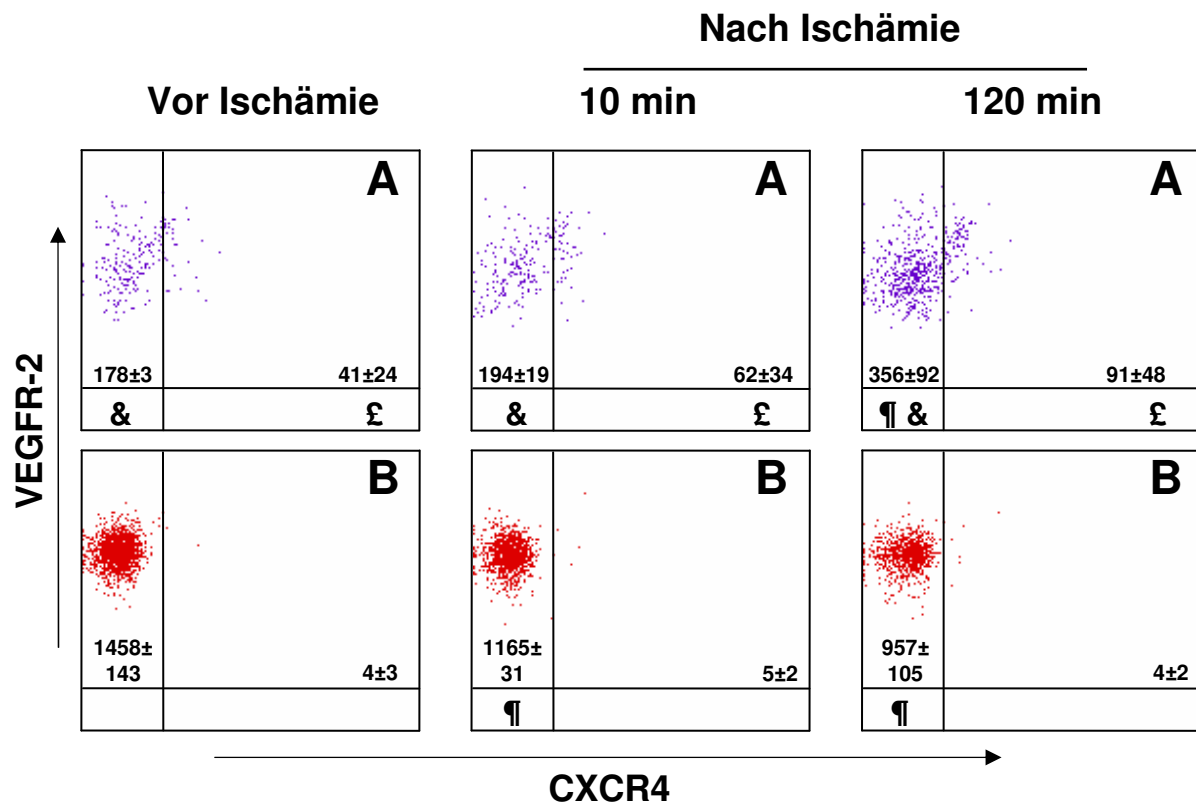


Abbildung 3 B:

**FACS Darstellung der Expression von VEGFR-2 und CXCR4 bei CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen vor, 10 min nach und 120 min nach Ischämie**

A entspricht CD 34- / CD 133+ Zellen

B entspricht CD 34+ / CD 133+ Zellen

¶  $p < 0.05$  vs. vor Ischämie VEGFR-2+ /CXCR4- Zellen in A oder B

&  $p < 0.05$  vs. VEGFR-2+ /CXCR4- Zellen in B zum Zeitpunkt vor Ischämie, 10 min und 120 min nach Ischämie

£  $p < 0.05$  vs. VEGFR-2+ /CXCR4+ Zellen in B zum Zeitpunkt vor Ischämie, 10 min und 120 min nach Ischämie

### **5.3. CD 34- / CD 133+ EPC werden in stabilen koronaren Läsionen exprimiert und in instabilen koronaren Läsionen hochreguliert**

Bereits im humanen Ischämiemodell konnte ein höherer Umsatz von CD 34+ / CD 133+ EPC und eine Hochregulation von CD 34- / CD 133+ EPC an ischämischen Orten gezeigt werden. Dieses Modell beschreibt jedoch die frühe Verteilung von CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen nach frischem endothelialem Schaden. Um die Verteilung von CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen nach länger bestehenden endothelialem Schaden näher zu beschreiben, wurden stabile und instabile koronaren Läsionen sowie In-Stent-Restenosen humaner koronarer Atherektomien auf das Vorhandensein von CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC untersucht. Hierzu wurden von Patienten gewonnene Atherektomien mittels Gefrierschnitten immunhistochemisch, wie unter Methoden beschrieben, untersucht. Zusätzlich sollten über die differenzierte Betrachtung unterschiedlicher Schweregrade (klinisch stabile koronare Läsionen vs. klinisch akute, instabile koronare Läsionen) und unterschiedlicher pathophysiologischer Mechanismen (stabile und instabile koronare Läsionen vs. In-Stent-Restenosen) nähere funktionelle Aussagen über die CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen gemacht werden.

Die Untersuchung der stabilen und instabilen koronaren Läsionen humaner koronarer Atherektomien (n = 6 pro Bedingung) erbrachte folgende Ergebnisse: Wie in den Abb. 4A und 4B (siehe Seiten 62 und 63) erkennbar ist, konnten sowohl in stabilen wie auch in instabilen koronaren Läsionen CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC nachgewiesen werden. Innerhalb der stabilen koronaren Läsionen konnten signifikant ( $p = 0,004$ ) mehr CD 34+ / CD 133+ ( $2,72 \pm 2,56$ ) als CD 34- / CD 133+ EPC ( $1,51 \pm 1,56$ ) nachgewiesen werden. Bei instabilen koronaren Läsionen werden beide EPC Subpopulationen hochreguliert, jedoch sind dort signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr CD 34- / CD 133+ ( $8,27 \pm 2,28$ ) als CD 34+ / CD 133+ EPC ( $4,53 \pm 1,46$ ) nachweisbar. Die Untersuchung der In-Stent-Restenosen humaner koronarer Atherektomien (n = 6) zeigte, dass innerhalb von In-Stent-Restenosen weder CD 34- / CD 133+ noch CD 34+ / CD 133+ EPC nachweisbar sind (siehe Abb. 4B Seite 63).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl CD 34+ / CD 133+ als auch CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulationen möglicherweise an regenerativen Prozessen an bereits länger bestehenden endothelialen Läsionen, wie z.B. in atherosklerotischen Läsionen, beteiligt sind.

Zusätzlich zeigen die Ergebnisse, dass an klinisch akuten, instabilen koronaren Läsionen mehr CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC als an klinisch weniger akuten, stabilen koronaren Läsionen nachweisbar sind. Insbesondere die CD 34- / CD 133+ EPC zeigen eine hohe Expression in klinisch akuten instabilen koronaren Läsionen weshalb ihnen möglicherweise eine wichtige Funktion innerhalb der endothelialen Regeneration zukommt. Die Tatsache, dass in In-Stent-Restenosen weder CD 34- / CD 133+ noch CD 34+ / CD 133+ EPC nachweisbar sind ist mit der aktuellen pathophysiologischen Vorstellung der Genese der In-Stent-Restenose ausgehend von glatten Gefäßmuskelzellen der Media vereinbar. Im Gegensatz dazu gehen Gefäßverengungen bei stabilen und instabilen koronaren Läsionen vorwiegend von der endothelialen Intimaschicht des Gefäßes aus. Dies unterstützt die Annahme, dass CD 34+ / CD 133+ und CD 34- / CD 133+ EPC eine wichtige Funktion insbesondere innerhalb der endothelialen Regeneration zukommt.

Abbildung 4 AB:

**CD 34- / CD 133+ EPC werden in stabilen koronaren Läsionen exprimiert und in instabilen koronaren Läsionen hochreguliert**

Gefrierschnitte koronarer Atherektomien von Patienten mit stabilen koronaren Läsionen, instabilen koronaren Läsionen oder In-Stent-Restenosen wurden mit Antikörpern oder entsprechenden Isotypenkontrollen markiert (n = 6 pro Bedingung, 30 Sektionen innerhalb der Läsion pro Individuum).

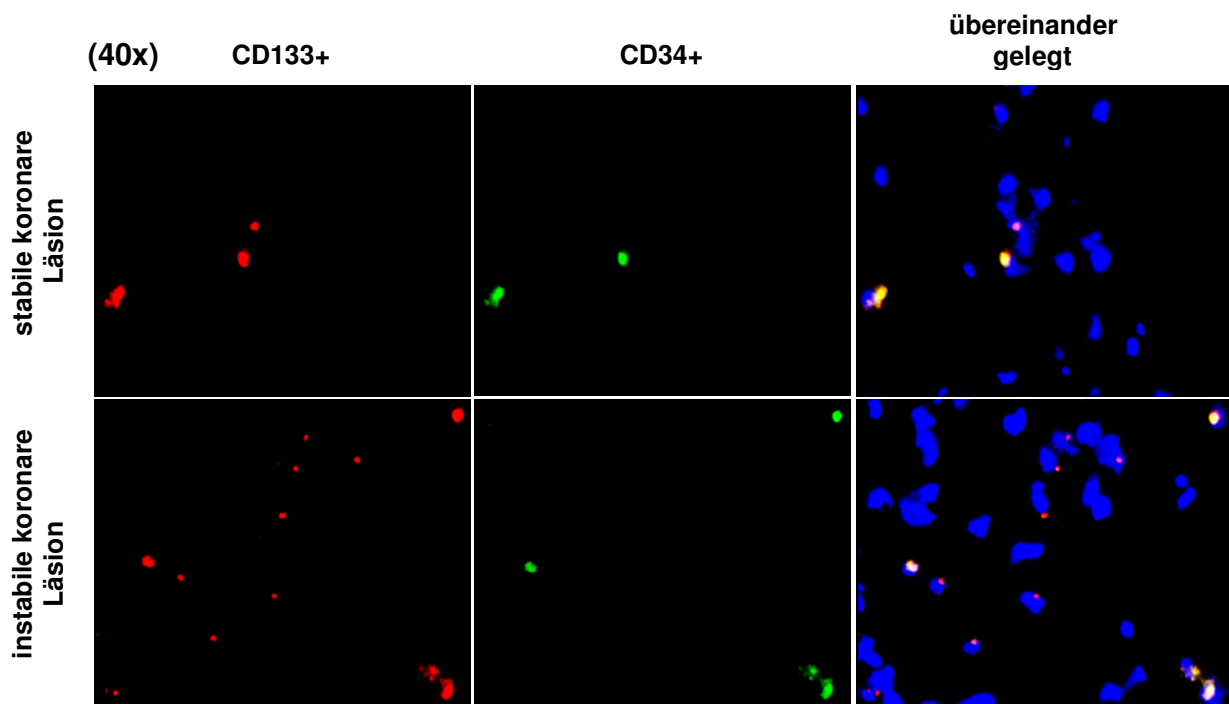


Abbildung 4 A

**Immunhistochemische Darstellung CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen in stabilen und instabilen koronaren Läsionen**

Die Schnitte wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD 133 und CD 34 sowie DAPI nach den oben beschriebenen Methoden immunhistochemisch gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. CD 34 FITC stellt sich hier grün, CD 133 PE rot und DAPI blau dar. Als CD 34+ / CD 133+ positiv wurden nur Zellen ausgezählt bei denen die Fluoreszenzen DAPI, FITC und PE (weiß dargestellt) übereinander lagen. Als CD 34- / CD 133+ positiv wurden nur Zellen ausgezählt bei denen die Fluoreszenzen DAPI und PE (rosa dargestellt) übereinander lagen (40x Vergrößerung).



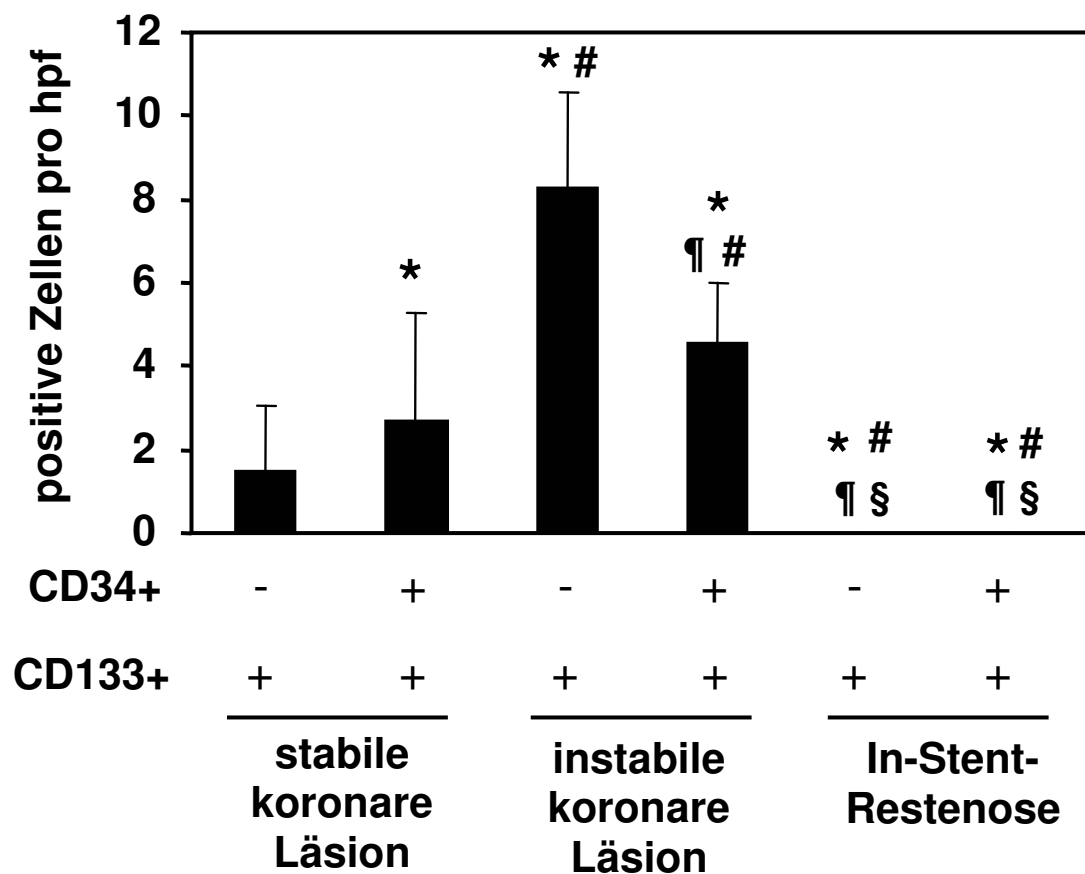


Abbildung 4 B:

**Mittelwert und Standardabweichung CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen in stabilen und instabilen koronaren Läsionen sowie In-Stent-Restenosen**

\*  $p < 0.05$  vs. CD 34- / CD 133+ Zellen in stabilen Läsionen

#  $p < 0.05$  vs. CD 34+ / CD 133+ Zellen in stabilen Läsionen

¶  $p < 0.05$  vs. CD 34- / CD 133+ Zellen in instabilen Läsionen

§  $p < 0.05$  vs. CD 34+ / CD 133+ Zellen in instabilen Läsionen

#### **5.4. Transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC fördern die Reendothelialisierung und vermindern die Größe vaskulärer Läsionen**

Ausgehend von *in vitro* Versuchen in Zellkultur und den statischen Adhäsionsversuchen, sowie den *in vivo* Versuchen anhand von Ischämie-Modellen und immunhistochemischer Untersuchungen koronarer Läsionen sollten die bisherigen Ergebnisse in einem geschlossenen *in vivo* Tiermodell vereint und um den Aspekt der Gefäßreparation erweitert werden.

Hierzu wurde ein *in vivo* Modell mit immunsupprimierten Nacktmäusen verwendet. Zusammengefasst wurden diesen Nacktmäusen eine artifizielle einseitige ischämische arterielle Läsion induziert und anschließend humane CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ oder CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC Subpopulationen transplantiert. Nach 14 Tagen wurden die Größe und die Regeneration der ischämischen Läsionen untereinander verglichen sowie das Ausmaß der Neoangiogenese bestimmt. Im Detail wurden den Nacktmäusen im Vorfeld der Transplantation Angiogenesekissen implantiert, die nur das Einwachsen neuer Kapillaren erlaubten und nach Explantation wie unter Methoden beschrieben, auf Neoangiogenese untersucht wurden. Zusätzlich wurde den Nacktmäusen unmittelbar vor der Transplantation eine einseitige Carotis externa Läsion wie in den Methoden beschrieben induziert. Hierdurch wurde eine einseitige frische ischämische Läsion induziert, die gesunde Gegenseite diente als Kontrolle. Anschließend wurden die Nacktmäuse in drei Gruppen aufgeteilt (n = 5 pro Gruppe) und pro Tier 1 x 10<sup>5</sup> Bead-aufgereinigte humane fluoreszenz-markierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC, CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC oder NaCl als Kontrolle pro Gruppe transplantiert.

Untersucht werden sollte insbesondere inwieweit es 14 Tage nach Induktion arterieller Läsionen und Transplantation von CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC, CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC oder NaCl zu einer Regeneration der ischämischen Areale kommt. Diese drei Bedingungen wurden miteinander verglichen, wobei als Vergleichsparameter die neointimale Fläche und der Lumenumfang, wie unter Methoden beschrieben, bestimmt wurden. Dadurch sollte eine mögliche Reduktion der neointimalen Fläche sowie eine Zunahme des Lumenumfangs nach Transplantation im Vergleich zu einfacher NaCl Injektion gezeigt werden. Zusätzlich wurden noch die mit CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC und die mit CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantierten Mäuse untereinander verglichen. Hierdurch sollten möglich Unterschiede im vasoregenerativen Potential zwischen den EPC Subpopulationen untersucht werden. Da die Läsionen nur einseitig induziert wurden

konnte bei jeder Maus noch die Seite mit der artifiziell induzierten Läsion mit der nativen Gegenseite ohne artifizielle Läsion verglichen werden um nichtläsionsspezifische Effekte der Transplantation auszuschließen.

Wie in den Abb. 5A und 5D (siehe Seiten 71 und 74) zu sehen ist zeigte sich in Kontrolltieren, denen NaCl injiziert wurde ( $n = 5$ ), auf der Seite der induzierten arteriellen Läsion die Bildung einer prominenten signifikanten ( $p < 0,001$ ) neointimalen Fläche ( $105.772 \pm 22.210 \mu\text{m}^2$ ) mit einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktion des Lumenumfanges ( $849 \pm 81 \mu\text{m}$ ). Im Vergleich dazu zeigten die gleichen Kontrolltiere auf der nativen Gegenseite eine altersentsprechende gesunde neointimalen Fläche ( $675 \pm 148 \mu\text{m}^2$ ) sowie einen altersentsprechenden Lumenumfang ( $1370 \pm 103 \mu\text{m}$ ).

Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich bei Nacktmäusen, denen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden ( $n = 5$ ), auf der Seite der arteriellen Läsion eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der neointimalen Fläche ( $61.294 \pm 5224 \mu\text{m}^2$ ) mit einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Zunahme des Lumenumfanges ( $1085 \pm 77 \mu\text{m}$ ). Auf der nativen Gegenseite zeigte sich bei Nacktmäusen denen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden eine altersentsprechende gesunde neointimalen Fläche ( $719 \pm 92 \mu\text{m}^2$ ) sowie eine altersentsprechender Lumenumfang ( $1379 \pm 256 \mu\text{m}$ ) und somit keine EPC-assoziierte Veränderung. Die entsprechenden Ergebnisse sind graphisch in den Abb. 5A und 5D dargestellt.

Nacktmäuse, denen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden ( $n = 5$ ), zeigten auf der Seite der arteriellen Läsion eine nochmals stärkere signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der neointimalen Fläche ( $46.284 \pm 6737 \mu\text{m}^2$ ) sowie eine größere signifikante ( $p < 0,001$ ) Zunahme des Lumenumfanges ( $1216 \pm 106 \mu\text{m}$ ) als Empfänger von CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC. Auf der nativen Gegenseite zeigte sich bei Nacktmäusen nach Transplantation von CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC eine altersentsprechende gesunde neointimalen Fläche ( $666 \pm 92 \mu\text{m}^2$ ) sowie ein altersentsprechender Lumenumfang ( $1465 \pm 202 \mu\text{m}$ ) und somit keine EPC-assoziierte Veränderung. Die entsprechenden Ergebnisse sind graphisch in den Abb. 5A und 5D dargestellt.

Im Vergleich zwischen den beiden EPC Subpopulationen zeigten mit CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantierte Nacktmäuse auf der Seite der arteriellen Läsion eine

signifikant ( $p < 0,001$ ) stärkere Reduktion der neointimalen Fläche ( $46.284 \pm 6737 \mu\text{m}^2$ ) mit signifikant größerer ( $p < 0,001$ ) Zunahme des Lumenumfanges ( $1216 \pm 106 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zu Nacktmäusen mit arteriellen Läsion denen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden (neointimalen Fläche:  $61.294 \pm 5224 \mu\text{m}^2$ ; Lumenumfang:  $1085 \pm 77 \mu\text{m}$ ). Die entsprechenden Ergebnisse sind graphisch in den Abb. 5A und 5D dargestellt.

Zusammenfassend konnte bezüglich der Regeneration der ischämischen Areale gezeigt werden, dass Nacktmäuse denen EPC Subpopulationen transplantiert wurden eine Reduktion der neointimalen Fläche und Zunahme des Lumenumfanges im Vergleich zur salinen Kontrolle aufwiesen. Dabei zeigten Nacktmäuse denen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden eine verstärkte Reduktion der neointimalen Fläche sowie eine verstärkte Zunahme des Lumenumfanges im Vergleich zu Nacktmäusen denen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden.

Zusätzlich sollte untersucht werden, inwiefern es nach Transplantation zu einer Reendothelialisierung der Läsionen kommt und ob die transplantierten EPC Subpopulationen tatsächlich an der Reendothelialisierung der Läsionen beteiligt sind. Hierzu wurden die transplantierten EPC Subpopulationen vor der Transplantation mit PKH 26 rot fluoreszenzmarkiert. Nach Entnahme der Carotiden konnte anhand von Gefrierschnitten die Endothelschicht der Läsionen mit CD 31-FITC dargestellt werden. Diese Schicht wurde dann auf das Vorhandensein von PKH 26 rot positiven Zellen untersucht. Dadurch sollten die transplantierten EPC Subpopulationen innerhalb der regenerierten Endothelschicht identifiziert werden. Als Vergleichsparameter wurden der prozentuale Anteil der Endothelzellen sowie der prozentuale Anteil PKH 26 rot positiver Endothelzellen, wie unter Methoden beschrieben, bestimmt.

Um die Reendothelialisierung zu bestimmen wurde der prozentuale Anteil der Endothelzellen der gesunden Seite ohne Läsion zum prozentualen Anteil der Endothelzellen der Seite mit Läsion in Relation gesetzt. Zur Bestimmung des Anteils PKH 26 rot positiver Endothelzellen wurde der prozentuale Anteil PKH 26 rot positiver Endothelzellen innerhalb der Endothelschicht zum prozentualen Anteil der Endothelzellen der gesamten Endothelschicht in Relation gesetzt. Dabei wurden jeweils mit CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC oder mit CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantierte Mäuse und entsprechende Kontrollen, die lediglich NaCl erhielten, miteinander verglichen. Dadurch sollte eine verstärkte

Reendothelialisierung sowie eine Beteiligung transplanteder EPC Subpopulationen an der Reendothelialisierung im Vergleich zu einfacher NaCl Injektion untersucht werden. Zusätzlich wurden noch die mit CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC und die mit CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantierten Mäuse untereinander verglichen. Hierdurch sollten mögliche Unterschiede des Reendothelialisierungspotentials zwischen den EPC Subpopulationen herausgestellt werden. Da die Läsionen nur einseitig induziert wurden, konnte bei jeder Maus noch die Seite mit der artifiziell induzierten Läsion mit der nativen Gegenseite ohne artifizielle Läsion verglichen werden um nichtläsionsspezifische Effekte der Transplantation auszuschließen

Wie in den Abb. 5B, 5C und 5E (siehe Seiten 72, 73 und 75) erkennbar ist zeigten Kontrolltiere, denen lediglich NaCl injiziert wurde ( $n = 5$ ), auf der Seite der induzierten arteriellen Läsion einen signifikant ( $p < 0,001$ ) verminderten prozentualen Anteil an Endothelzellen ( $34 \pm 3\%$ ) im Vergleich zu dem der nativen Gegenseite (100 %). Dies entspricht dem zu erwartenden Bild nach Induktion einer einseitigen arteriellen Läsion.

Nacktmäuse, denen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden ( $n = 5$ ), zeigten auf der Seite der arteriellen Läsion eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Zunahme des prozentualen Anteils an Endothelzellen ( $60 \pm 1\%$ ) im Vergleich zu Kontrolltieren ( $34 \pm 3\%$ ), denen lediglich NaCl injiziert wurde. Zusätzlich konnten PKH 26 rot positive Endothelzellen innerhalb der Endothelschicht ( $12 \pm 2\%$ ) auf der Seite der arteriellen Läsion nachgewiesen werden. Auf der nativen Gegenseite zeigte sich eine unauffällige Endothelschicht (100%) jedoch auch mit PKH 26 rot positiven Endothelzellen ( $0,3 \pm 0,5\%$ ) innerhalb der Endothelschicht. Dieser Anteil ist signifikant ( $p < 0,001$ ) geringer als auf der Seite der arteriellen Läsion. Die entsprechenden Ergebnisse sind graphisch in den Abb. 5B, 5C und 5E dargestellt.

Nacktmäuse, denen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden ( $n = 5$ ), zeigten auf der Seite der arteriellen Läsion eine nochmals stärkere signifikante ( $p < 0,001$ ) Zunahme des prozentualen Anteils an Endothelzellen ( $95 \pm 1\%$ ) im Vergleich zu Kontrolltieren ( $34 \pm 3\%$ ), denen lediglich NaCl injiziert wurde. Zusätzlich konnten nochmals mehr PKH 26 rot positive Endothelzellen ( $18 \pm 4\%$ ) innerhalb der Endothelschicht auf der Seite der arteriellen Läsion nachgewiesen werden. Auf der nativen Gegenseite zeigte sich eine unauffällige Endothelschicht (100%) jedoch auch mit PKH 26 rot positiven

Endothelzellen ( $0,3 \pm 0,5\%$ ) innerhalb der Endothelschicht. Dieser Anteil ist signifikant ( $p < 0,001$ ) geringer als auf der Seite der arteriellen Läsion. Die entsprechenden Ergebnisse sind graphisch in den Abb. 5B, 5C und 5E dargestellt.

Im direkten Vergleich zwischen den beiden EPC Subpopulationen zeigten Nacktmäuse, denen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden, auf der Seite der arteriellen Läsion eine signifikant ( $p < 0,001$ ) größere Zunahme des prozentualen Anteils an Endothelzellen ( $95 \pm 1\%$ ) sowie einen signifikant ( $p < 0,001$ ) höheren Anteil PKH 26 rot positive Endothelzellen ( $18 \pm 4\%$ ) innerhalb der Endothelschicht. Im Vergleich dazu zeigten Nacktmäuse, denen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden, auf der Seite der arteriellen Läsion eine geringere Zunahme des prozentualen Anteils an Endothelzellen ( $60 \pm 1\%$ ) sowie einen geringeren Anteil PKH 26 rot positive Endothelzellen ( $12 \pm 2\%$ ) innerhalb der Endothelschicht. Die entsprechenden Ergebnisse sind graphisch in den Abb. 5B, 5C und 5E dargestellt.

Zusammenfassend konnte bezüglich der Reendothelialisierung der Läsionen und der daran beteiligten transplantierten EPC Subpopulationen gezeigt werden, dass Nacktmäuse denen PKH 26 rot positive EPC Subpopulationen transplantiert wurden, PKH 26 rot positive Endothelzellen innerhalb ihrer Endothelschicht aufwiesen. Dabei zeigten Nacktmäuse, denen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden, eine verstärkte Rekrutierung von CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC an den Ort der Läsion mit einem höheren Anteil an transplantierten CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC innerhalb der Endothelschicht sowie eine vermehrte Reendothelialisierung im Vergleich zu Nacktmäusen denen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden.

Abschließend sollte untersucht werden inwiefern es nach Transplantation aufgrund des ischämischen Reizes der Läsion zu einer Neoangiogenese kommt. Hierzu wurden den Nacktmäusen im Vorfeld der Transplantation Angiogenesekissen subkutan implantiert, die ein Einwachsen neuer Kapillaren erlaubten, und nach Explantation wie unter Methoden beschrieben auf Neoangiogenese untersucht wurden. Als Vergleichsparameter wurde die Neoangiogenese fläche bestimmt. Auch hier wurden jeweils mit CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC oder mit CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantierte Mäuse und entsprechende Kontrollen, die lediglich NaCl erhielten, miteinander verglichen. Dadurch sollte eine verstärkte Neoangiogenese aufgrund des ischämischen Reizes der Läsion nach

Transplantation im Vergleich zu einfacher NaCl Injektion untersucht werden. Zusätzlich wurden noch die mit CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC und die mit CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantierten Mäuse untereinander verglichen. Hierdurch sollten mögliche Unterschiede des neoangiogenetischen Potentials zwischen den EPC Subpopulationen dargestellt werden.

Wie in Abb. 5F (siehe Seite 76) erkennbar zeigten Kontrolltiere, denen lediglich NaCl injiziert wurde ( $n = 5$ ), nur eine geringe Neoangiogenese fläche ( $19229 \pm 535 \mu\text{m}^2$ ). Nacktmäuse, denen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden ( $n = 5$ ), zeigten eine signifikant ( $p < 0,001$ ) größere Neoangiogenese fläche ( $32940 \pm 5796 \mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zur Neoangiogenese fläche ( $19229 \pm 535 \mu\text{m}^2$ ) von Kontrolltieren. Nacktmäuse, denen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden ( $n = 5$ ), zeigten auch eine signifikant ( $p < 0,001$ ) größere Neoangiogenese fläche ( $33016 \pm 5291 \mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zur Neoangiogenese fläche ( $19229 \pm 535 \mu\text{m}^2$ ) von Kontrolltieren. Im direkten Vergleich zwischen den beiden EPC Subpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Größe der Neoangiogenese fläche.

Zusammenfassend konnte bezüglich der Neoangiogenese gezeigt werden, dass Nacktmäuse nach Transplantation von EPC Subpopulationen eine verstärkte Neoangiogenese im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Dabei zeigten sich jedoch im Vergleich zwischen den beiden EPC Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 5 ABCDEF (auf den folgenden Seiten):

**Transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC fördern die Reendothelisierung sowie die Neoangiogenese und vermindern die Größe vaskulärer Läsionen**

Nacktmäusen mit implantierten Angiogenesekissen wurden einseitige Carotis Läsionen induziert. Die Nacktmäuse wurden in 3 Gruppen aufgeteilt ( $n = 5$  pro Gruppe): Mäuse die als Kontrollgruppe NaCl über die Schwanzvene erhielten, Mäuse die mit PKH 26 rot markierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC erhielten und Mäuse die mit PKH 26 rot markierte CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC erhielten ( $1 \times 10^5$  Bead aufgereinigte humane EPC in 0.5 ml NaCl resuspendiert pro Tier). Carotiden mit und ohne Läsion wurden 14 Tage nach dem Eingriff zur weiteren immunhistochemischen sowie morphometrischen Untersuchung, wie unter Methoden beschrieben, entnommen und untersucht (25 Sektionen wurden pro Tier untersucht).

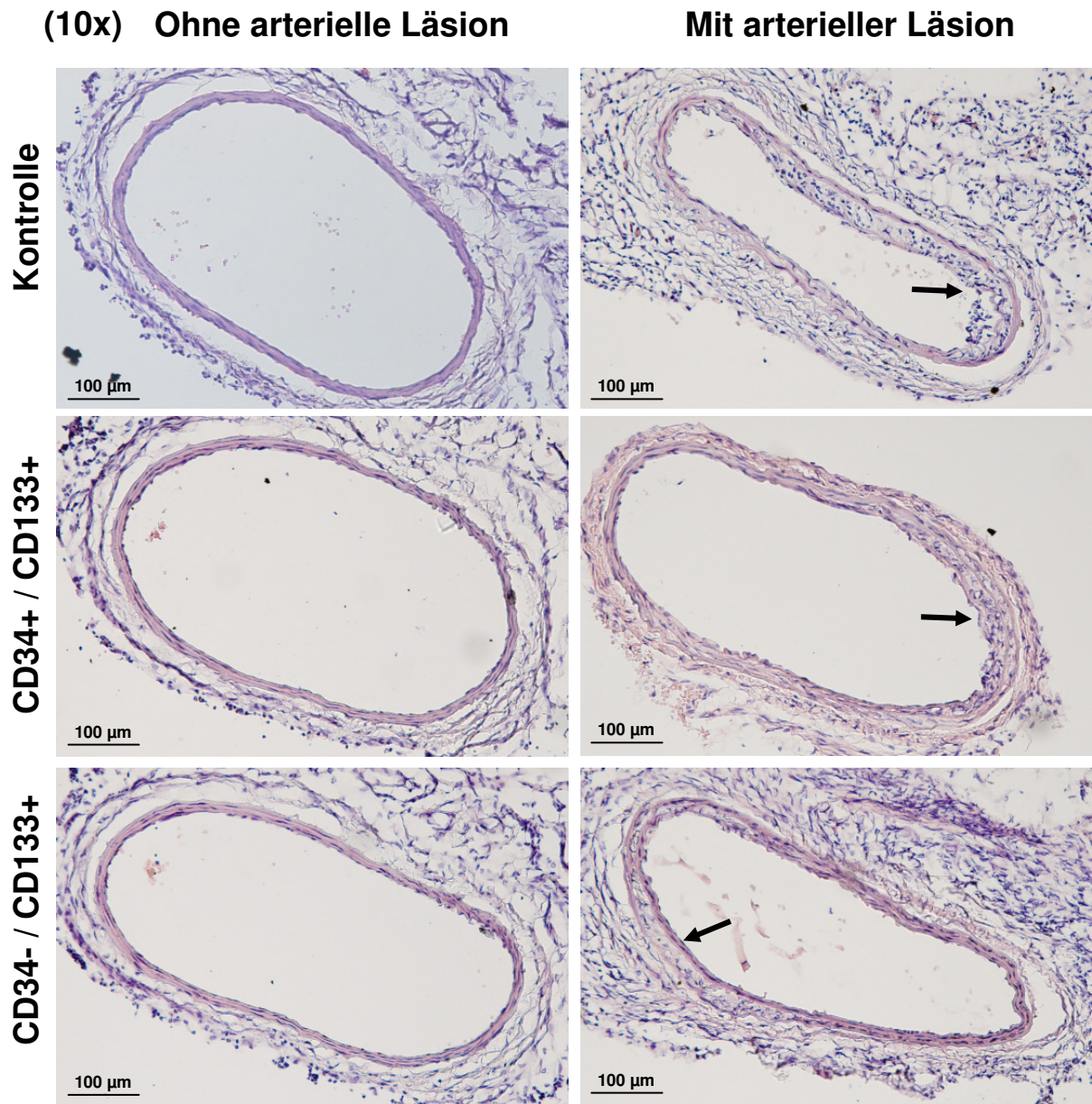


Abbildung 5 A:

**Hämatoxylin / Eosin Färbung von Gefrierschnitten der Arteria Carotis mit und ohne arterieller Läsion**

Die Färbung wurde nach standardisierten Protokollen durchgeführt. Die Pfeile weisen Läsionsgebiete aus (10x Vergrößerung).



(10x) übereinander gelegt: PKH26 / CD31 / DAPI

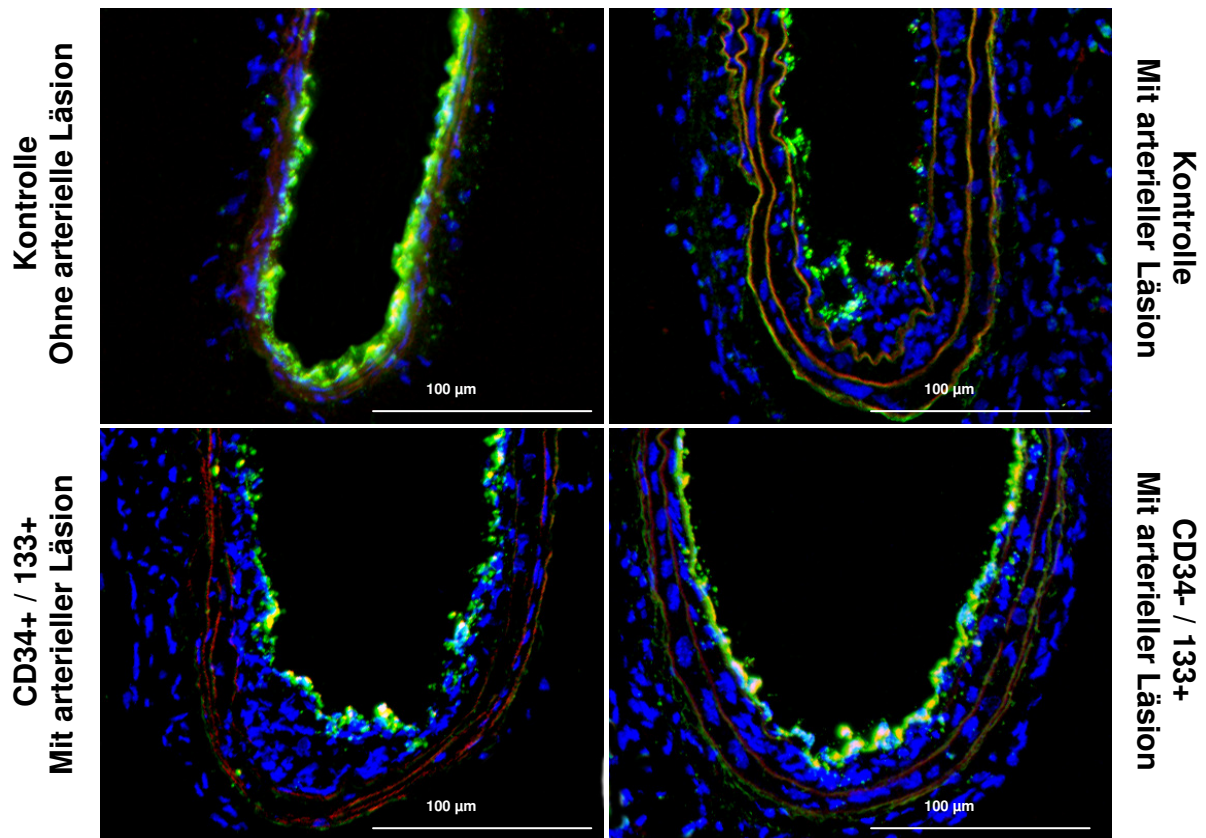


Abbildung 5 B:

**Immunhistochemische Darstellung transplanterter CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen innerhalb der Endothelschicht von Gefrierschnitten der Arteria Carotis und entsprechenden Kontrollen (10x)**

Um die Rekrutierung von transplantierten EPC Subpopulationen und die Reendothelialisierung an Läsionen zu untersuchen, wurden Gefrierschnitte der Arteria Carotis mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD 31 FITC und PKH 26 rot sowie DAPI immunhistochemisch, wie unter Methoden beschrieben, gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. CD 31 FITC stellt sich hier grün, PKH 26 rot und DAPI blau dar. Als CD 31 positive Endothelzellen wurden nur Zellen ausgezählt bei denen die Fluoreszenzen DAPI und FITC (grün dargestellt) übereinander lagen. Als PKH 26 rot+ / CD 31+ positive Endothelzellen wurden nur Zellen ausgezählt bei denen die Fluoreszenzen DAPI, FITC und PKH (weiß dargestellt) übereinander lagen (10x Vergrößerung).

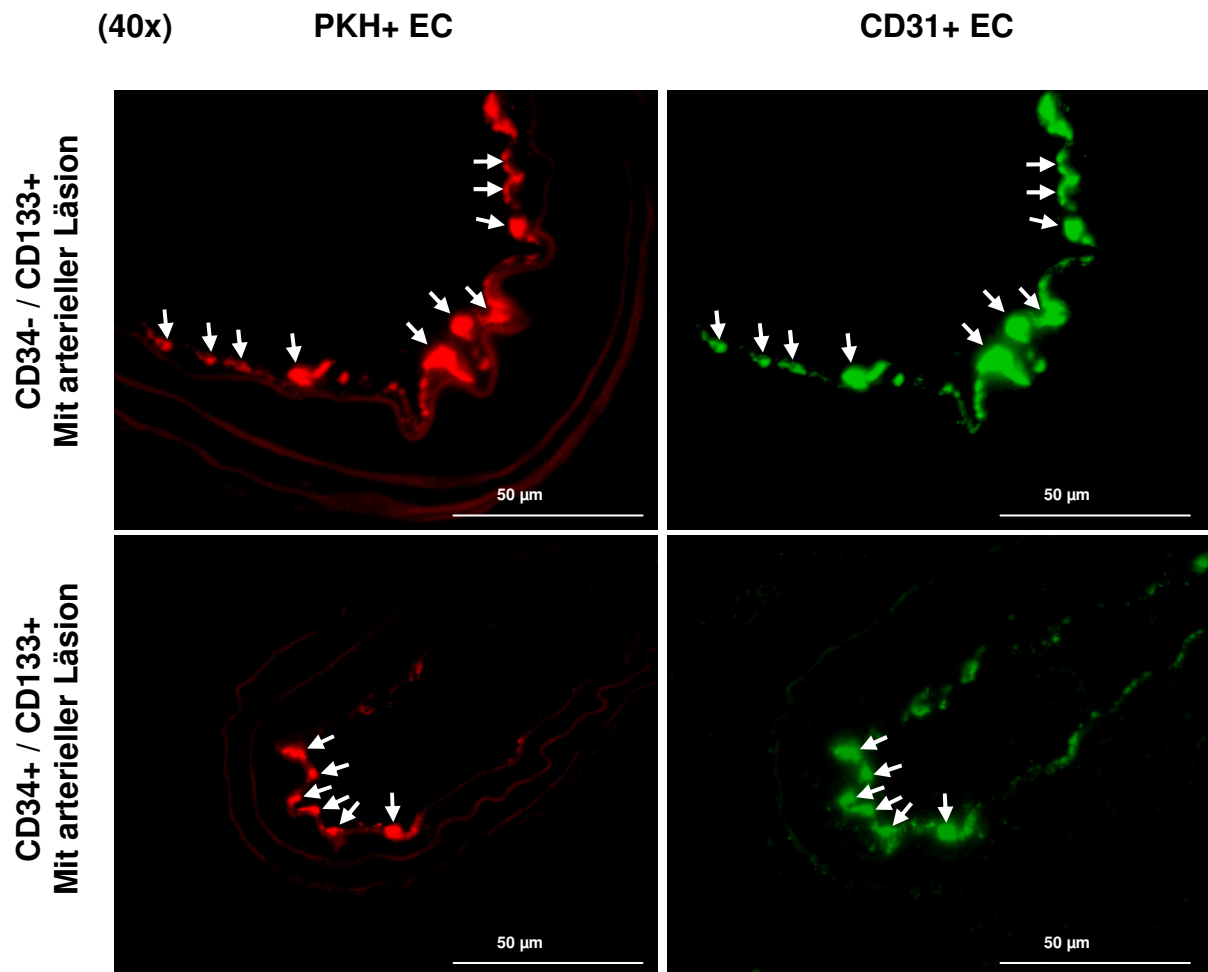


Abbildung 5 C:

**Immunhistochemische Darstellung transplanteder CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen innerhalb der Endothelschicht von Gefrierschnitten der Arteria Carotis (40x)**

Um die Rekrutierung von transplantierten EPC Subpopulationen und die Reendothelialisierung an Läsionen zu untersuchen, wurden Gefrierschnitte der Arteria Carotis mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD 31 FITC und PKH 26 rot sowie DAPI (hier nicht abgebildet) immunhistochemisch, wie unter Methoden beschrieben, gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. CD 31 positive Endothelzellen stellt sich hier grün und PKH 26 markierte EPC rot dar (40x Vergrößerung).

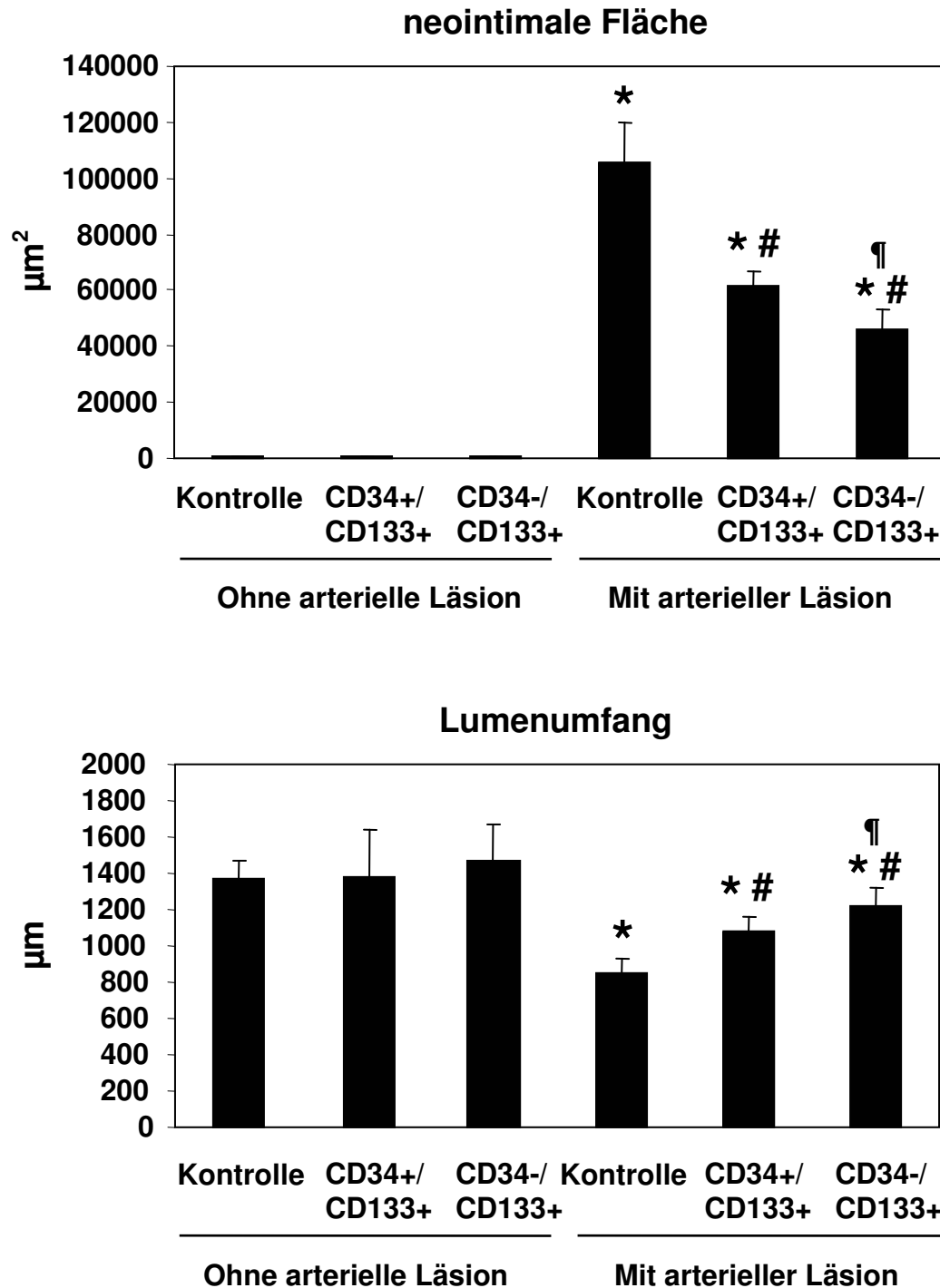


Abbildung 5 D:

**Mittelwert und Standardabweichung der neointimalen Fläche und des Lumenumfanges der Arteria Carotis nach Transplantation von CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen und entsprechende Kontrollen**

\*  $p < 0.05$  vs. Mäuse ohne arterielle Läsion

#  $p < 0.05$  vs. NaCl transplantierte Kontrolle mit arterieller Läsion

¶  $p < 0.05$  vs. CD 133+ / CD 34+ transplantierte Zellen mit arterieller Läsion

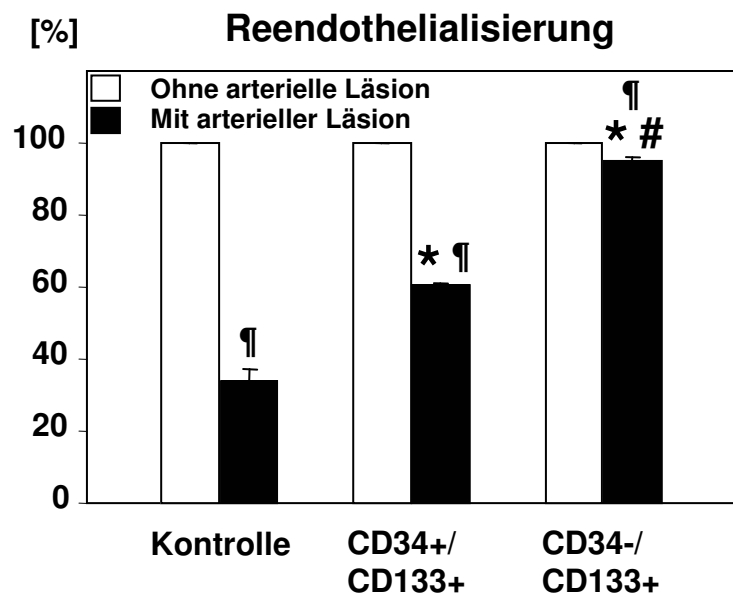
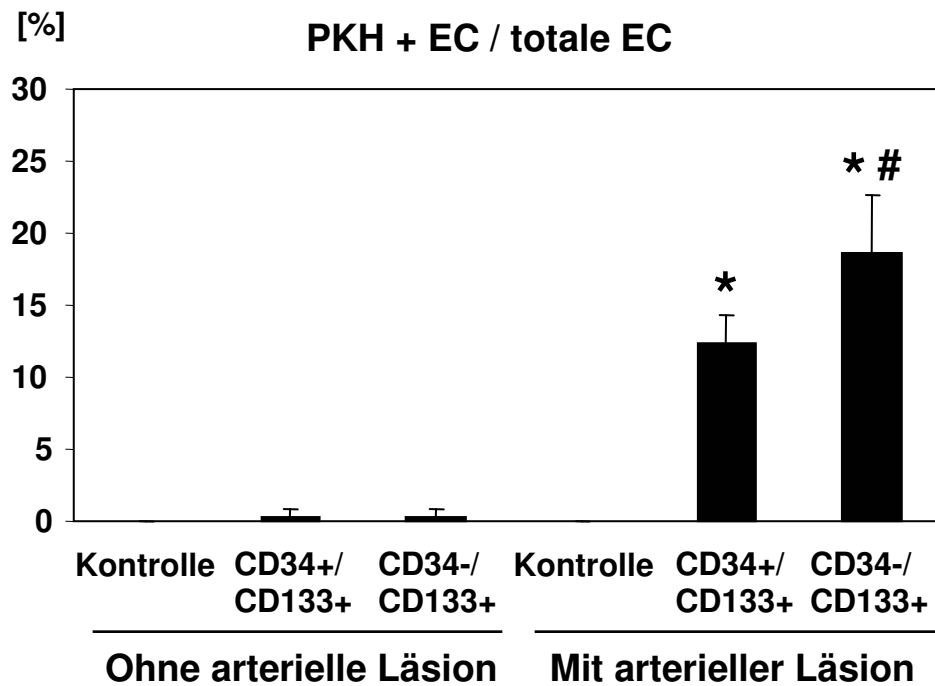


Abbildung 5 E:

**Mittelwert und Standardabweichung des Anteils transplantierte EPC an allen Endothelzellen sowie Mittelwert und Standardabweichung der Reendothelialisierung nach Transplantation von CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen und entsprechende Kontrollen**

\*  $p < 0.05$  vs. NaCl transplantierte Kontrolle mit arterieller Läsion

#  $p < 0.05$  vs. CD 133+ / CD 34+ transplantierte Zellen mit arterieller Läsion

¶  $p < 0.05$  vs. Mäuse ohne arterielle Läsion

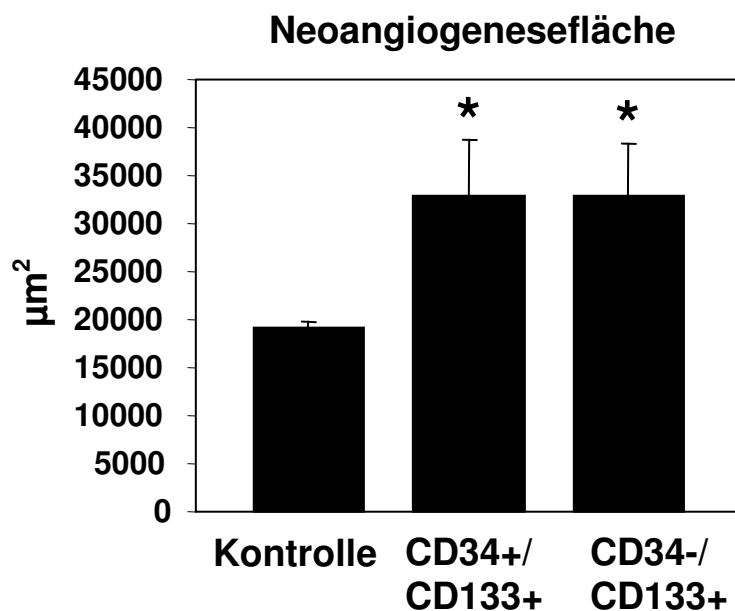
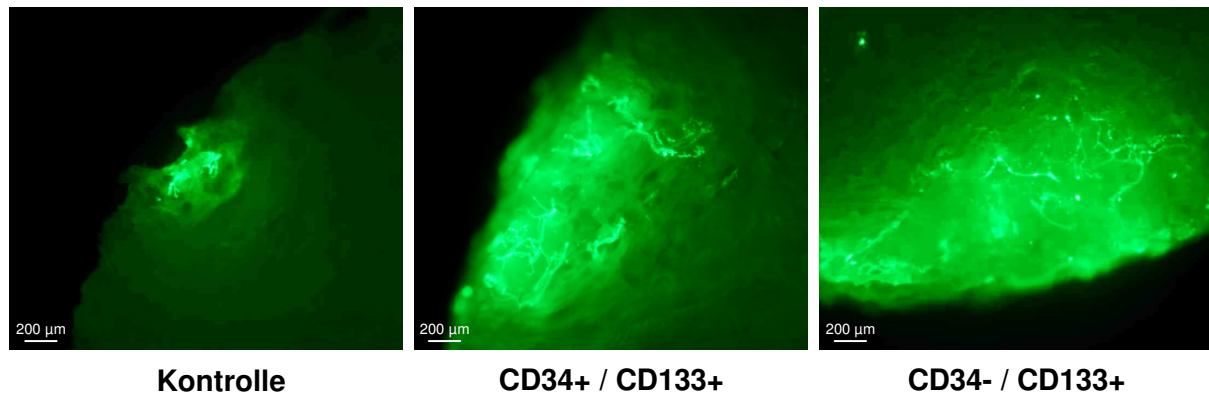


Abbildung 5 F:

**Immunhistochemische Darstellung der Neoangiogenese sowie Mittelwert und Standardabweichung nach Transplantation von CD 34- / CD 133+ und CD 34+ / CD 133+ Zellen und entsprechende Kontrolle.**

Darstellung und Quantifizierung der Neoangiogenese anhand von subkutan implantierten Angiogenesekissen nach Markierung mit fluoreszierenden Mikrosphären

\*  $p < 0.05$  vs. NaCl transplantierte Kontrolle

## 6. Diskussion

### 6.1. CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC sind eine dritte EPC Subpopulation und Vorläufer von CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC

EPC sind eine heterogene Gruppe von Zellen. Klassische EPC werden über die Oberflächenmarker CD 34, CD 133 und VEGFR-2 (KDR oder Flk-1) definiert. Reifere EPC verlieren ihre Expression von CD 133 und exprimieren noch CD 34 sowie VEGFR-2. Haben EPC einen endothelialen Phänotyp erreicht, so werden sie über die Oberflächenmarker CD 34, VEGFR-2 sowie durch die Aufnahme von Dil-Ac-LDL und die Bindung von endothelspezifischen Lektinen wie *Ulex europaeus* charakterisiert (Peichev et al. 2000; Gehling et al. 2000; Handgretinger et al. 2003; Shmelkov et al. 2005). In dieser Arbeit konnte eine neue frühere EPC Subpopulation identifiziert werden. Diese wird im Gegensatz zu klassischen EPC erstmalig über die Oberflächenmarker CD 133 und VEGFR-2, jedoch ohne den Oberflächenmarker CD 34, definiert (siehe auch Abb. 6 Seite 80).

In den ersten Berichten über die postnatale Neovaskulogenese werden EPC durch die Kombination der Oberflächenmarker CD 34 und Flk-1 / KDR definiert. CD 34 ist ein Marker der hämatopoetischen Stammzelllinie. Während der Differenzierung von frühen zu reiferen hämatopoetischen Stammzellen vermindert sich die Expression von CD 34. Außerdem wird CD 34 noch in geringerem Ausmaß von adulten Endothelzellen exprimiert. Somit findet sich CD 34 auf dem Spektrum von der frühen hämatopoetischen Stammzelle bis zur adulten Endothelzelle. Flk-1 entspricht VEGFR-2 in Mäusen und KDR ist das humane Homolog von VEGFR-2. Flk-1, KDR und VEGFR-2 werden in diesem Zusammenhang synonym verwendet. VEGFR-2 ist der Rezeptor für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor. Dieser Rezeptor wird sowohl von frühen hämatopoetischen Stammzellen, als auch von Endothelzellen exprimiert und verringert sich ebenfalls während der hämatopoetischen Differenzierung. Somit findet sich auch VEGFR-2 auf dem Spektrum von der frühen hämatopoetischen Stammzelle bis zur adulten Endothelzelle. Diese ungenaue Charakterisierung der EPC erschwerte anfänglich die Differenzierung zwischen EPC und reifen Endothelzellen. Es warf die Frage auf, ob die postnatale Neovaskulogenese auf zirkulierende reife Endothelzellen, unreife EPC oder weitere monozytäre Zellen zurückzuführen sei (Asahara et al. 1997).

Erst die Entdeckung des frühen Stammzellmarkers CD 133 auf CD 34+ und VEGFR-2+ EPC ließ eine weitere Kategorisierung der EPC Population zu (Peichev et al. 2000). CD 133 wurde hierbei als pluripotenter früher Stammzellmarker identifiziert. CD 133 wird von frühen Stammzellen exprimiert und verliert seine Expression bei reiferen Stammzellen. Hierin liegt der große Vorteil gegenüber CD 34 und VEGFR-2, die sowohl von frühen Stammzellen, als auch von weiter differenzierten Zellen exprimiert werden. In diesem Zusammenhang konnte auch eine CD 133+ / CD 34+ / VEGFR-2+ EPC Population nachgewiesen werden. Unter *in vitro* Bedingungen ließen sich CD 133+ / CD 34+ / VEGFR-2+ EPC in CD 133- / CD 34+ / VEGFR-2+ endothelspezifische Zellen weiterdifferenzieren. Diese Erkenntnis ließ erstmals eine weitere Kategorisierung der EPC Population in eine frühe CD 133+ / CD 34+ / VEGFR-2+ Population sowie einer reifere CD 133- / CD 34+ / VEGFR-2+ Population zu (Peichev et al. 2000; Gehling et al. 2000). Hierdurch ließen sich erstmals EPC in ihrer Differenzierung zeitlich kategorisieren. Während man bei der CD 133+ / CD 34+ / VEGFR-2+ EPC Population annimmt, dass es sich um frühere Progenitorzellen handelt, geht man bei der CD 133- / CD 34+ / VEGFR-2+ EPC Population von reiferen Progenitorzellen entlang der Differenzierung zu endothelspezifischen Zellen aus. Dies begründet sich in der Annahme, dass CD 133 als früher Stammzellmarker seine Expression während der weiteren Differenzierung verliert. Hingegen werden CD 34 und VEGFR-2 sowohl von hämatopoetischen Stammzelllinien, als auch von adulten Endothelzellen exprimiert (Rafii et al. 2003; Urbich et al. 2004).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen auf eine dritte, noch primordialere EPC Subpopulation hin. Diese EPC Subpopulation trägt die Oberflächenmarker CD 133 und VEGFR-2, jedoch nicht CD 34. Diese Annahme wird unterstützt durch Arbeiten von Nakamura et al. 2003. Diese Arbeitsgruppe konnte Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen gewinnen, die CD 34- waren und auch keine weiteren endothelialen Differenzierungsmarker sowie Stammzelllinienmarker aufwiesen. Unter *in vitro* Bedingungen wurde gezeigt, dass diese Zellen CD 34+ werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass CD 34- Stammzellen Vorläufer von CD 34+ Stammzellen sind. In ähnlicher Weise konnten die in dieser Arbeit identifizierten und isolierten CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC unter *in vitro* Bedingungen, in CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC weiter differenziert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu reiferen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC eine frühere EPC Subpopulation

entlang der endothelialen Differenzierung sind. Hierdurch kann die heterogene Gruppe der EPC in ihrer zeitlichen Differenzierung noch genauer kategorisiert werden.

Zusätzlich lässt sich die oben beschriebene CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC Subpopulation von einer von Rehman et al. 2003 beschriebenen EPC Population monozytären Ursprungs abgrenzen. Diese ist charakterisiert durch eine hohe Expression des monozytären Oberflächenmarkers CD 14 ( $95.7 \pm 0.3\%$ ) und eine geringe Expression des Oberflächenmarkers CD 133 ( $0.16 \pm 0.05\%$ ). Die in dieser Arbeit beschriebene CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC Subpopulation weist jedoch keine Expression des Oberflächenmarkers CD 14 auf. Eine graphische Darstellung der Expression der hier dargestellten Oberflächenmarkerexpression auf den untersuchten EPC Populationen in ihrem zeitlichen Verlauf zeigt Abb. 6.

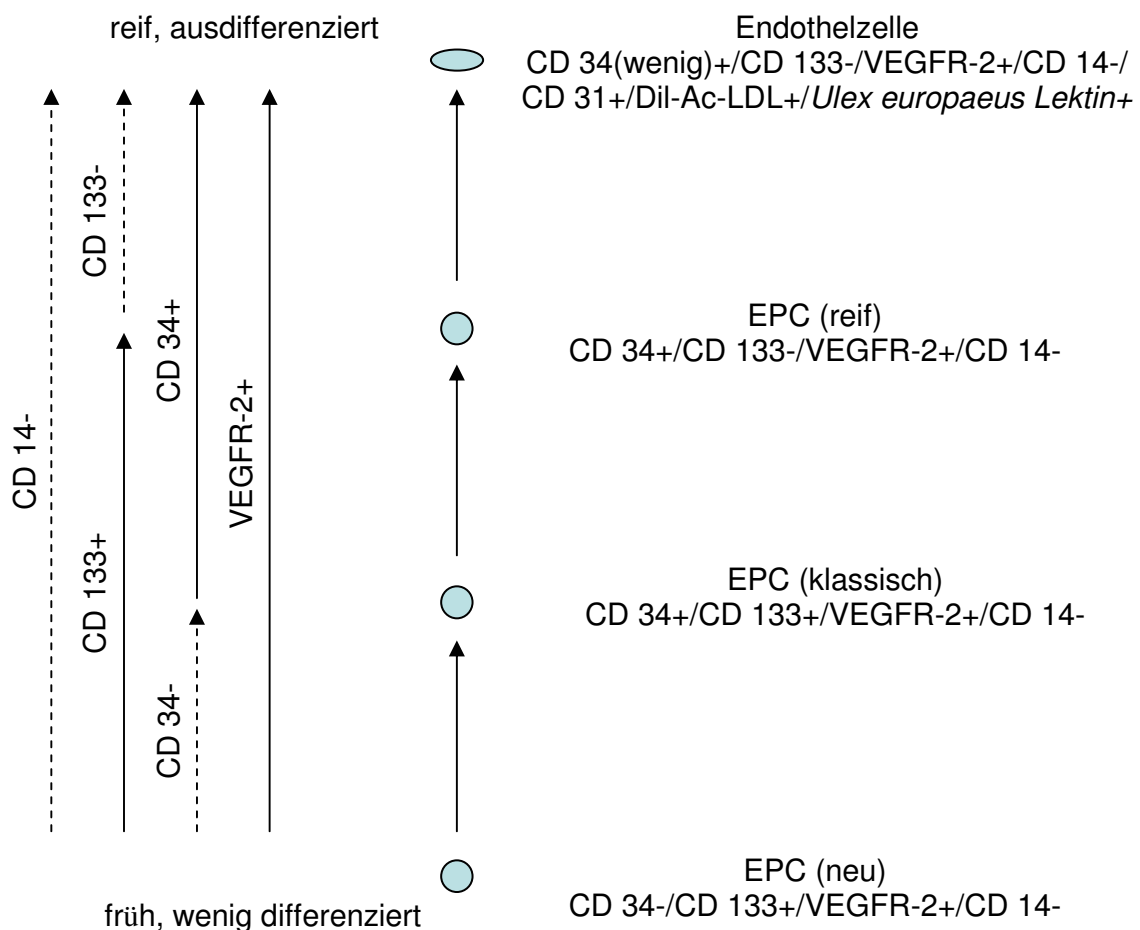


Abbildung 6:

Darstellung der hier untersuchten EPC Populationen in ihrer zeitlichen Entwicklung.



Die Gesamtheit der Daten weist auf die Existenz einer frühen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC Subpopulation hin, welche schon den frühen Stammzellmarker CD 133 sowie VEGFR-2 exprimiert. Allerdings weist diese Subpopulation weder den klassischen EPC Marker CD 34 noch den monozytär spezifischen Marker CD 14 auf.

Frühere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass CD 34- Stammzellen ein hohes replikatives sowie regeneratives Potential besitzen. Vorarbeiten von Stamm et al. 2003 zeigten bereits, dass CD 34- / CD 133+ Stammzellen, transplantiert nach akutem Myokardinfarkt, eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion sowie eine auffällige Verbesserung der Perfusion des infarzierten Bereiches bewirkten. Auch Vorarbeiten von Kuci et al. 2003 zeigten, dass frisch isolierte CD 34- im Vergleich zu CD 34+ Stammzellen eine wesentlich ausgeprägtere Kolonienbildung aufweisen. Hierbei stellt die Kolonienbildung ein Maß für das replikative Potential der Stammzellen dar.

Diese frühe CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC Subpopulation zeigt unter die Endotheldifferenzierung fördernden *in vitro* Bedingungen eine Zunahme der Expression von CD 34. Im weiteren Verlauf kommt es zur Aufnahme von endothelspezifischen Markern wie Dil-Ac-LDL und zur Bindung von *Ulex europaeus* Lektin und CD 31, womit die Zellen einen reifen endothelspezifischen Phänotyp zeigen. Im Vergleich zur reiferen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC Subpopulation zeigt die beschriebene frühere EPC Subpopulation unter *in vitro* Bedingungen zusätzlich ein höheres quantitatives Potential sich in reifere Zellen mit endothelspezifischen Phänotyp zu differenzieren. Auch dies spricht für eine frühere EPC Subpopulation, da diese ein höheres replikatives Potential besitzt als die schon weiter differenzierte reifere EPC Subpopulation.

Abschließend muss jedoch festgestellt werden, dass die An- bzw. Abwesenheit von vier unterschiedlichen Oberflächenmarkern auf einer Zelllinie sowie das replikative Potential sicherlich noch keine eindeutige Beschreibung einer Stammzelllinie erlaubt. Jedoch erweitern die oben dargestellten Daten, auch im Zusammenhang der angegebenen Literatur, den aktuellen Wissensstand über EPC. Welche Rolle diese Subpopulation im Zuge der endothelialen Differenzierung spielt und welche weiteren Differenzierungslinien möglich sind könnten in Zukunft Einzelzellkulturen zeigen. Ferner bedarf es zusätzlicher Erkenntnisse bezüglich weiterer Stammzellmarker, die nicht nur Aufschluss über die zeitliche Entwicklung einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle geben könnten, sondern auch über die

räumliche Verteilung früher Stammzellen im Organismus. Somit könnte eine genauere Charakterisierung der EPC ermöglicht werden. Letztendlich sind auch weitere Erkenntnisse über den Einfluss von Zytokinen erforderlich, um die Differenzierung in verschiedene Zelllinien sowie die Rekrutierung an Orte des Bedarfs besser verstehen zu können.

## **6.2. CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC werden vermehrt an Orten von Ischämie rekrutiert und weisen eine höhere SDF-1 $\alpha$ vermittelte Adhäsion auf**

Im gesunden Organismus machen EPC lediglich 0.01% aller Zellen in der Zirkulation aus. Allerdings kommt es nach Traumata zur raschen Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark in die Zirkulation auf bis zu 12% aller zirkulierenden Zellen. Vaskuläre Traumata, chirurgische Manipulationen und ischämische Verhältnisse fördern die Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark und deren Migration in ischämische Regionen (Rafii et al. 2003). Dort konnte gezeigt werden, dass sie zu vermehrter Neovaskularisation sowie funktioneller Regeneration führen. Hierbei spielt der SDF-1 $\alpha$  und sein entsprechender Rezeptor CXCR4 eine essentielle Rolle in der Mobilisierung und Rekrutierung von EPC an ischämische Orte im Rahmen der postnatalen Vaskulogenese (Walter et al. 2005).

Die in dieser Arbeit untersuchte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC Subpopulation zeigte im humanen Ischämiemodell eine erhöhte Expression des CXCR4 Rezeptors nach Ischämie sowie eine Hochregulation am ischämischen Ort. Im Gegensatz dazu kam es bei den CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC zu einer Herabregulation am ischämischen Ort. Um dies zu erklären sind drei mögliche Gründe zu diskutieren.

1. Unter der Annahme, dass es sich bei den CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC um eine reifere EPC Subpopulation handelt, könnte deren Abnahme im ischämischen Bezirk mit einer erhöhten Inkorporation im ischämischen Gewebe zu erklären sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine im Vergleich zu den CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC erhöhte Expression des VEGFR-2 Rezeptors. Dieser Rezeptor steht im engen Zusammenhang mit Endothelialisierung und Neovaskulogenese (Nowak et al. 2004). Dies bedeutet, dass eine der reifen Endothelzelle näher stehende, schon weiter differenzierte CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC zuerst inkorporiert wird, um einen ischämischen Endothelschaden zu regenerieren, bevor frühere noch weniger reife CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC

inkorporiert werden. Es kommt durch diesen peripheren Verbrauch zu einer relativen Abnahme der CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC in der Zirkulation und zu einer Zunahme innerhalb der ischämisch geschädigten Endothelschicht.

2. Der Anstieg der CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im ischämischen Bezirk lässt sich durch eine vermehrte Mobilisierung früherer, möglicherweise potenterer EPC aus dem Knochenmark erklären. Diese Annahme ist mit der erhöhten Expression des CXCR4-Rezeptors in Einklang zu bringen, der eine essentielle Rolle in der Mobilisierung und Rekrutierung von EPC an ischämische Orte im Rahmen der postnatalen Vaskulogenese (Walter et al. 2005) spielt. Möglicherweise ist dies auf eine vermehrte SDF-1 $\alpha$ / CXCR4 vermittelte Adhäsion zurückzuführen, die wiederum eine vermehrte Mobilisierung zur Folge hat. Frühere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass eine lokale SDF-1 $\alpha$  Erhöhung eine vermehrte Mobilisierung sowie Neovaskularisation bewirkt (Hiasa et al. 2004). Um diese Möglichkeit ein- bzw. auszuschließen, könnten in Zukunft ähnliche Ischämieversuche anhand von Knochenmarksbestrahlten bzw. nicht-knochenmarksbestrahlten Versuchstieren näheren Aufschluss liefern.

3. Lokale, ischämieinduzierte Faktoren führen zu einer Differenzierung der einzelnen EPC Subpopulationen. Möglicherweise führen bisher noch nicht identifizierte Faktoren zu einer lokalen Differenzierung von bisher unbekannten EPC Subpopulationen zu CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC und analog von CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC zu hier nicht untersuchten Zelllinien.

In zukünftigen Studien müssten die hier diskutierten Mechanismen genauer untersucht werden. Nach aktuellem Stand der Literatur wird jedoch die Annahme einer aus dem Knochenmark mobilisierten EPC Population am meisten unterstützt. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen auf CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC als EPC Subpopulation mit potentem regenerativen Potential hin.

Die Annahme, dass es sich bei CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC um frühere und potentere EPC handelt findet in der Literatur zusätzliche Unterstützung. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass aus peripherem Blut gewonnene angereicherte CD 133+ EPC sich in Kultur unter Zugabe von Flt3 / Flk2 und Interleukin-6 entweder spontan oder durch Zugabe von „stem cell factor“ in eine CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulation differenzieren ließen. Diese trugen weder Marker für hämatopoetische Stammzellen, Endothelzellen, mesenchymale Zellen, dendritische Zellen noch stromale Fibroblasten. Die CD 34- / CD

133+ EPC wurden nicht-fettleibigen, diabetischen, immunsupprimierten Mäusen (non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice), die zuvor ganzkörperbestrahlt wurden, transplantiert. Es zeigte sich im Vergleich zu frisch isolierten CD 34+ Zellen im Anschluss eine wesentlich ausgeprägtere Kolonienbildung (Kuci et al. 2003). Hierbei stellt die Kolonienbildung ein Maß für das replikative Potential der Stammzellen dar. Die in der Arbeit von Kuci et al. beschriebene CD 34- / CD 133+ EPC Subpopulation stellt eine frühe noch wenig differenzierte EPC Population dar, die noch ein hohes replikatives Potential sowie ein hohes Differenzierungspotential besitzt.

Andere Arbeiten konnten mit einem anderen Ansatz ein ähnlich hohes regeneratives Potential von CD 34- / CD 133+ EPC belegen. Hierbei wurden Infarktpatienten mittels eines koronaren Bypasses versorgt. Während der Operation wurden im akuten Stadium des Infarktes aus dem Knochenmark gewonnene autologe CD 34- / CD 133+ Stammzellen in die Randzone des Infarktes injiziert. Diese Patienten zeigten im Anschluss eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion sowie eine auffällige Verbesserung der Perfusion des infarzierten Bereiches (Stamm et al. 2003). Diese Ergebnisse weisen auf ein hohes regeneratives Potential von CD 34- / CD 133+ EPC hin.

Dass transplantierte EPC tatsächlich an der Regeneration geschädigter Gewebe beteiligt sind, und dort inkorporiert werden, und nicht andere Faktoren diesen Prozess initiieren, konnten Arbeiten von Yang et al. zeigen. Dabei wurde Nacktmäusen, denen zuvor eine künstliche Extremitätenischämie induziert wurde, aufgereinigte CD 133+ EPC aus Nabelschnurblut in die Schwanzvene injiziert. Im Anschluss konnte eine Inkorporation dieser Zellen in kapilläre Strukturen der ischämischen Extremität nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich eine vermehrte Neovaskularisation sowie eine verbesserte Durchblutung nach der Ischämie an der entsprechenden Extremität (Yang et al. 2004).

Alternativ muss man in Betracht ziehen, dass die Verschiebung der Verhältnisse beider EPC Subpopulationen zueinander auch auf ischämiebedingte Mediatoren oder Zytokine und lokale Differenzierung zurückzuführen sein könnte. Dies bedeutet einerseits, dass die reiferen CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC nicht im ischämischen Gewebe inkorporiert werden, sondern sich lediglich weiterdifferenziert haben. Somit sind sie einer weiteren Detektierung über die Oberflächenmarker CD 34, CD 133 und VEGFR-2 entgangen. Andererseits bedeutet dies, dass die früheren CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC nicht aus dem Knochenmark

mobilisiert werden, sondern sich aus einer bisher unbekannten, zirkulierenden Vorläuferpopulation in CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC weiterdifferenziert haben.

Inwieweit CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC in ischämische Bezirke inkorporiert und CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC aus dem Knochenmark bei Ischämie mobilisiert werden müssen weiterführende Studien zeigen. Es sollte einerseits die mediatorbedingte Differenzierung und andererseits eine genauere Charakterisierung der EPC innerhalb des endothelialen Differenzierungsprozesses beleuchtet werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC vermehrt an Orten von Ischämie rekrutiert werden und eine erhöhte Expression von CXCR4 zeigen. Dies weist auf eine wichtige Funktion für die endotheliale Regeneration hin.

### **6.3. CD 34- / CD 133+ EPC werden in stabilen koronaren Läsionen höher exprimiert als in instabilen koronaren Läsionen**

Wie schon unter Pathophysiologie der Atherosklerose dargelegt (siehe 3.4. Seite 14), werden atherosklerotische Läsionen unter anderem durch eine endotheliale Schädigung der Intima des Gefäßes initiiert und unterhalten. Es kommt zur Adhäsion und Invasion von Makrophagen und T-Lymphozyten sowie zu Migration und Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen mit zunehmender Stenosierung des befallenen Gefäßes (Libby et al.1997).

Hierbei werden stabile und instabile Läsionen unterschieden. Instabile Läsionen zeichnen sich durch ein erhöhtes Rupturrisiko aus. Bedingt ist dies durch ihre dünne fibröse Hülle, durch vermehrte inflammatorische Aktivität und nur wenige glatte Muskelzellen am Ort der Plaqueruptur. Zusätzlich weisen sie eine vermehrte Abschilferung von Endothelzellen auf der fibrösen Hülle auf. Der Verlust des endothelialen Schutzes fördert die Rupturanfälligkeit der fibrösen Hülle und trägt zu zunehmender Instabilität bei (Dietel et al. 2002; Libby 2002). Im Gegensatz dazu sind stabile Plaques mit einer dichten extrazellulären Matrix und einer relativ dicken fibrösen Hülle ohne vermehrte Gewebefaktoren resistenter gegenüber einer Ruptur. Beide Prozesse gehen von der Intima des geschädigten Gefäßes aus (Dietel et al. 2002; Libby 2002). Hingegen findet sich bei In-Stent-Restenosen eine unterschiedliche pathophysiologische Situation. Hierbei geht man nach heutigem Verständnis davon aus, dass

die In-Stent-Restenose hauptsächlich auf eine Neointimaproliferation, verursacht durch ein frühes Einsprossen glatter Muskelzellen, zurückzuführen ist. Dieser Prozess geht von der Media des geschädigten Gefäßes aus (Farb et al. 1999).

In letzter Zeit ergaben sich vermehrt Hinweise, dass die Gefäßregeneration nicht nur auf benachbarte Endothelzellen innerhalb der Gefäßwand zurückzuführen sei. Vielmehr gibt es zunehmende Hinweise, dass aus dem Knochenmark stammende EPC an Reparaturprozessen innerhalb des kardiovaskulären Systems eine wichtige Rolle übernehmen (Carmeliet et al. 1997; Asahara et al. 1997). Ausgehend von diesen Vorarbeiten sowie den Ergebnissen im in dieser Arbeit beschriebenen Ischämiemodell, wurden weitere Untersuchungen an koronaren Atherektomien durchgeführt.

Im Ischämiemodell zeigte sich, dass CD 34<sup>-</sup> / CD 133<sup>+</sup> EPC nach frischem endothelialem Schaden hochreguliert werden. Bei der Untersuchung koronarer Atherektomien sollte untersucht werden, inwiefern CD 34<sup>+</sup> / CD 133<sup>+</sup> und CD 34<sup>-</sup> / CD 133<sup>+</sup> EPC Subpopulationen an Regenerationsprozessen in stabilen und instabilen koronaren Läsionen sowie In-Stent-Restenosen beteiligt sind.

Bei der Untersuchung koronarer Atherektomien ließen sich sowohl CD 34<sup>+</sup> / CD 133<sup>+</sup> als auch CD 34<sup>-</sup> / CD 133<sup>+</sup> EPC in stabilen und in instabilen Läsionen nachweisen. Interessanterweise fanden sich in instabilen Läsionen mehr CD 34<sup>+</sup> / CD 133<sup>+</sup> und CD 34<sup>-</sup> / CD 133<sup>+</sup> EPC als in stabilen Läsionen. Hierfür kann zum einen die erhöhte inflammatorische Aktivität in instabilen Läsionen ursächlich sein. Zum anderen weisen instabile Läsionen eine vermehrte Abschilferung von Endothelzellen auf (Libby 2002; Lusis 2000). Beide Faktoren führen über einen verstärkten vasoregenerativen Prozess zur Destabilisierung einer rupturgefährdeten Läsion. Es kommt zur vermehrten Rekrutierung von CD 34<sup>+</sup> / CD 133<sup>+</sup> und CD 34<sup>-</sup> / CD 133<sup>+</sup> EPC an den Ort der instabilen Läsion. Die geringere Anzahl von CD 34<sup>+</sup> / CD 133<sup>+</sup> und CD 34<sup>-</sup> / CD 133<sup>+</sup> EPC in stabilen Läsionen ist hingegen möglicherweise darauf zurückzuführen, dass stabile Läsionen weniger rupturgefährdet sind. Die fibröse Hülle ist dicker, mit weniger endothelialen Defekten und einem verminderten inflammatorischen Geschehen. Somit ist der vasoregenerative Prozess eher vermindert, da die Läsion aktuell stabil ist.

In instabilen Läsionen ließen sich mehr CD 34- / CD 133+ als CD 34+ / CD 133+ EPC nachweisen. Dies ist mit einem erhöhten vasoregenerativen Potential der CD 34- / CD 133+ EPC, auch im Zusammenhang mit erhöhter Expression des CXCR4-Rezeptors und vermehrter Adhäsion, in Einklang zu bringen. Genauere Erkenntnisse könnten gezielte Studien erbringen, die die Gewebefaktor-vermittelte Adhäsion näher beleuchten. Beiden Läsionsformen gemeinsam ist ihr Ursprung ausgehend von der Intima des Gefäßes.

In In-Stent-Restenosen konnten wiederum weder CD 34- / CD 133+ noch CD 34+ / CD 133+ EPC nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedliche Pathophysiologie von In-Stent-Restenosen, mit dem Schwerpunkt einsprossender glatter Muskelzellen ausgehend von der Media des geschädigten Gefäßes, zurückzuführen.

Aufgrund der relativ geringen Probenzahl und der großen interindividuellen Variabilität solcher Läsionen wären größere zu untersuchende Kollektive wünschenswert. Einschränkung findet dies jedoch in der geringen Frequenz der Atherektomien im Vergleich zur perkutanen transluminären koronaren Angioplastie und Stentimplantation und der damit einhergehenden nur geringen Probenzahl. Im Zusammenhang mit den oben genannten Vorarbeiten von Asahara und Carmeliet, in denen die Funktion von EPC an Reparaturprozessen innerhalb des kardiovaskulären Systems beschrieben ist, erscheinen diese Erkenntnisse jedoch als durchaus plausibel und nicht als Zufallsprodukt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass CD 34- / CD 133+ EPC vermehrt in instabilen, akuten koronaren Läsionen sowie in stabilen koronaren Läsionen exprimiert werden, jedoch nicht in In-Stent-Restenosen, was auf eine Schlüsselfunktion für endotheliale Reparaturmechanismen hinweist.

#### **6.4. Transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC fördern die Reendothelialisierung sowie die Neoangiogenese und vermindern die Größe vaskulärer Läsionen**

Die Tatsache, dass aus dem Knochenmark stammende EPC an der Reendothelialisierung sowie an vaskulären Reparaturprozessen des adulten Gefäßes beteiligt sind, konnten bereits frühere Arbeitsgruppen anhand von Mausmodellen zeigen. Ausschlaggebend war hierbei die erhöhte Anzahl zirkulierender CD 34+ / KDR+ EPC. Einige Gruppen erhöhten die Zahl zirkulierender EPC über Statininduktion, andere transplantierten kultivierte EPC (Werner et al. 2002; Werner et al. 2003). Zusätzlich konnte eine vermehrte Neoangiogenese bei Mäusen mit erhöhter EPC Zirkulation anhand eines Angiogenesediskusmodells nachgewiesen werden (Laufs et al. 2004). Ausgehend von diesen Vorarbeiten sollte das vasoregenerative Potential der in dieser Arbeit beschriebenen frühen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC anhand eines Mausmodells und eines Angiogenesediskusmodells untersucht werden.

Das in dieser Arbeit gezeigte Xenotransplantationsmodell kam bezüglich der CD 34+ / VEGFR-2+ EPC zu ähnlichen Ergebnissen wie die oben erwähnten Arbeitsgruppen. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass frisch transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC vermehrt an Orten vaskulärer Läsionen rekrutiert werden. Zusätzlich zeigten sie ein vermehrtes Reendothelialisierungspotential durch Differenzierung in Endothelzellen sowie eine Verminderung von Läsionsgrößen. Die Ergebnisse wiesen auf eine erhöhte biologische Aktivität der frühen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC bezüglich der Rekrutierung an Orte ischämischer Läsionen, Reendothelialisierung sowie Gefäßreparation hin.

Hiermit gelingt die Zusammenführung der in dieser Arbeit beschriebenen einzelnen *in vitro* und *in vivo* Modelle in einem geschlossenen *in vivo* Modell. Alle Modelle weisen auf ein erhöhtes vasoregeneratives Potential von CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC hin. Dies bestätigt sich auch im Xenotransplantationsmodell. Im Folgenden sind die einzelnen Modelle bezogen auf das Xenotransplantationsmodell kurz besprochen. Um Wiederholungen zu vermeiden wird für eine ausführliche Diskussion der einzelnen Modelle auf die vorherigen Diskussionspunkte verwiesen.



Die in dieser Arbeit beschriebene *in vitro* Kultur humaner EPC Subpopulationen zeigt, dass CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC ein erhöhtes quantitatives Potential besitzen sich in Zellen mit endothelspezifischen Phänotyp zu differenzieren. Im *in vivo* Xenotransplantationsmodell zeigten frisch transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC eine vermehrte Reendothelialisierung durch vermehrte Differenzierung in Endothelzellen. Dies bestätigt die Ergebnisse der *in vitro* Kultur humaner EPC Subpopulationen. Dass die transplantierten EPC tatsächlich an der Reendothelialisierung beteiligt waren, wurde durch die PKH 26 rot Markierung der transplantierten EPC kontrolliert. Nur CD 31 und PKH 26 rot doppelpositive Endothelzellen waren auf transplantierte EPC zurückzuführen. Als Konsequenz der vermehrten Reendothelialisierung kam es zu einer Verminderung der neointimalen Fläche und einer Zunahme des Lumenumfangs. Insgesamt zeigte sich eine Verminderung der Läsionsgrößen.

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits den Einfluss einer intakten Endothelschicht auf ein gesundes Gefäß zeigen. Nach aktuellem Verständnis ist eine intakte Endothelschicht essentiell für die physiologischen Funktionen innerhalb der Vaskulatur (Kinlay et al. 2001). Metabolische Erkrankungen wie Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus oder mechanische Manipulationen führen zu einem Funktionsverlust sowie Verlust der Endothelschicht (Kinlay et al. 2001). Endothelialer Funktionsverlust sowie Abschilferung der Endothelschicht führen beide zu einer Zunahme der neointimalen Fläche mit zunehmender Einengung und letztendlicher Stenosierung des befallenen Gefäßsegmentes. Hingegen führen eine Verbesserung der endothelialen Funktion und eine vermehrte Reendothelialisierung zu einer Abnahme der neointimalen Fläche und zu einer verminderten Einengung des Gefäßes (Bauters et al. 1997; Libby et al. 1992; Kinlay et al. 2001).

Das Ausmaß der Reendothelialisierung der mit EPC transplantierten Mäuse ist jedoch nicht nur auf die transplantierten EPC zurückzuführen. Da die Mäuse noch über eigene EPC verfügen, die zusätzlich an der Reendothelialisierung beteiligt sind, muss man die Ergebnisse der Reendothelialisierung relativieren. Die zeigt sich an der Reendothelialisierung von Kontrolltieren. Der Vorteil der mit EPC transplantierten Mäuse bezüglich der Regeneration ist jedoch signifikant. Insbesondere mit CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantierte Mäuse zeigen hierbei die stärkste Reendothelialisierung.

Die in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* durchgeführten statischen Adhäsionsversuche zeigten, dass CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC eine vermehrte SDF-1 $\alpha$  abhängige Adhäsion aufweisen. Zusätzlich konnte das in dieser Arbeit beschriebene *in vivo* Ischämiemodell nachweisen, dass CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC unter ischämischen Bedingungen eine erhöhte Expression des CXCR4 Rezeptors, der mit höherer Adhäsion in Zusammenhang steht, aufweisen. Im *in vivo* Xenotransplantationsmodell zeigten frisch transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC eine vermehrte Rekrutierung und Adhäsion an die Läsionen. Dass tatsächlich die transplantierten EPC vermehrt adhären waren, wurde, wie oben beschrieben, über die PKH 26 rot Markierung belegt. Dies bestätigt die Ergebnisse der *in vitro* durchgeführten statischen Adhäsionsversuche und des Ischämiemodells.

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass lokale Läsionen ischämischer oder artherosklerotischer Natur über verschiedene Mediatoren eine Rekrutierung von zirkulierenden Stammzellen oder Progenitorzellen vermitteln. Diese Mediatoren leiten die zirkulierenden Stammzellen oder Progenitorzellen an den Ort der Läsion (Asahara et al. 1999; Orlic et al. 2001). Unter anderen konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion von SDF-1 $\alpha$  und dem CXCR4 Rezeptor eine wesentliche Rolle im „Verkehr“ und der Rekrutierung zirkulierender Lymphozyten und hämatopoetischer Stammzellen spielt. Die Bindung von SDF-1 $\alpha$  an den CXCR4 Rezeptor reguliert unter anderem Überleben, Proliferation, Chemotaxis, Migration und Adhäsion dieser Zellen (Dewan et al. 2006).

Auch ist hier festzustellen, dass die Rekrutierung und Adhäsion der transplantierten EPC nicht nur auf die eindimensionale Interaktion von SDF-1 $\alpha$  und dem CXCR4 Rezeptor zurückzuführen ist. Gerade bei *in vivo* Modellen muss eine multidimensionale Interaktion von inflammatorischen Faktoren, Zytokinen und Wachstumsfaktoren in Betracht gezogen werden. Weiterführende Studien müssen diese Interaktionen genauer beleuchten. Es zeigt sich jedoch sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* eine vermehrte Adhäsion von CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC.

Die in dieser Arbeit beschriebenen *in vivo* durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen humaner koronarer Atherektomien zeigen, dass CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC vermehrt in instabile

koronare Läsionen als in stabile koronare Läsionen rekrutiert werden. Im *in vivo* Xenotransplantationsmodell zeigten frisch transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC eine vermehrte Expression in den Läsionen. Dass tatsächlich die transplantierten EPC vermehrt nachweisbar waren, wurde, wie beschrieben, über die PKH 26 rot Markierung belegt. Dies bestätigt die Ergebnisse der *in vitro* durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen humaner koronarer Atherektomien.

Vorarbeiten belegten bereits, dass EPC an Reparaturprozessen innerhalb des kardiovaskulären Systems eine wichtige Rolle übernehmen (Carmeliet et al. 1997; Asahara et al. 1997). In ischämischem Gewebe oder bei Störung der Integrität der endothelialen Zellschicht konnte gezeigt werden, dass EPC aus dem Knochenmark in die Zirkulation mobilisiert werden. Von dort aus werden sie in die geschädigten Gewebe rekrutiert, sowie an Orten von Neovaskularisation eingebracht (Rafii et al. 2003; Urbich et al. 2004; Werner et al. 2003; Laufs et al. 2004).

Die Ergebnisse des humanen koronaren Atherektomiemodells sind allerdings nur bedingt mit dem Xenotransplantationsmodell zu vergleichen. Das Atherektomiemodell und das Xenotransplantationsmodell unterscheiden sich in der Entstehung ihrer Läsionen. Die Läsionen der Atherektomien sind lange Zeit über Lipideinlagerungen, Endotheldefekte, Adhäsion, Inflammation und Proliferation gewachsen. Hingegen sind die artifiziellen Läsionen über mechanisch induzierte Endotheldefekte binnen kurzer Zeit entstanden. Gemeinsam sind beiden Läsionen jedoch Endotheldefekte, die mediator-vermittelt zu einer Rekrutierung von EPC führen. Somit haben beide Modelle zwar eine unterschiedliche Ursache, besitzen jedoch eine gleiche pathophysiologische Endstrecke. Über Endotheldefekte kommt es zur Rekrutierung von EPC. Beide Modelle weisen eine vermehrte Expression von CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC auf.

Bezüglich der Neoangiogenese konnte gezeigt werden, dass Nacktmäuse, denen EPC Subpopulationen transplantiert wurden, eine verstärkte Neoangiogenese im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Dabei zeigten sich jedoch im Vergleich zwischen den beiden EPC Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede.

In anderen Arbeitsgruppen konnte bereits anhand eines Angiogenesediskusmodells eine vermehrte Neoangiogenese bei Mäusen mit erhöhter EPC Zirkulation nachgewiesen werden (Laufs et al. 2004).

Dass zwischen den beiden EPC Subpopulationen jedoch keine Unterschiede bezüglich der Neoangiogenese nachweisbar sind, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei um keine Läsion handelt an der ein Zusammenspiel von Gewebsmediatoren und Oberflächenrezeptoren zum Tragen kommt. Vielmehr bietet ein Angiogenesediskus lediglich die Möglichkeit zum Einsprossen von Gefäßen aus einem globalen Neoangiogenesereiz heraus. Dies könnte auch das Auftreten von Neoangiogenese bei Tieren erklären, die zwar eine Läsion erhielten, denen jedoch lediglich NaCl injiziert wurde. Auch hier erfordert das genauere Verständnis weiterführende Untersuchungen, die die Rekrutierung und Differenzierung von EPC untersuchen.

Im Zusammenhang mit transplantierten EPC stellt sich noch die Frage, weshalb bei Kontrolltieren die keine Carotis externa Läsionen erhielten, aber denen CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ oder CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC transplantiert wurden, auch PKH 26 rot+ / CD 31+ Endothelzellen innerhalb der endothelialen Schicht nachgewiesen werden konnten. Vorarbeiten konnten in ähnlichen Xenotransplantationsmodellen transplantierte EPC nur an Orten von Läsionen wieder finden (Werner et al. 2003). Da es sich um einen sehr kleinen prozentualen Anteil mit einer hohen Standardabweichung handelte (beide  $0,3 \pm 0,5\%$ ) ist dies möglicherweise darauf zurückzuführen, dass ein Tier aus der Gruppe bereits einen vaskulären Schaden hatte bevor es in die Studie aufgenommen wurde. Eine andere Möglichkeit besteht in einer basalen Inkorporationsrate von EPC in gesundes Endothel im Sinne einer Aufrechterhaltung einer gesunden Endothelschicht.

Generell stellt sich die Frage, warum die im humanen Organismus vorhandenen zirkulierenden EPC nicht in der Lage sind mit transplantierten Tieren vergleichbare Regenerationsergebnisse zu erbringen. Einerseits mag dies auf die große Anzahl von EPC zurückzuführen sein, die binnen kürzester Zeit durch Transplantation in die Zirkulation treten. Im Vergleich dazu erfolgt unter physiologischen Bedingungen erst eine sukzessive Mobilisierung aus dem Knochenmark. Zudem muss durch die Isolation und Aufbereitung von zu transplantierenden Zellen eine Aktivierung der Zellen, die die Rekrutierung und Adhäsion fördern, in Betracht gezogen werden.

Sicherlich sind die *in vitro* Modelle nur entfernt mit der Komplexität eines *in vivo* Modells vergleichbar. Es bedarf in Zukunft noch weiterführender Studien, die die genaueren Zusammenhänge zwischen Adhäsions- und Differenzierungsmediatoren und der Expression spezifischer Oberflächenrezeptoren näher beleuchten. Jedoch findet sich ein großer Teil der *in vitro* beobachteten Ergebnisse bezüglich eines erhöhten vasoregenerativen Potentials von CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Gegensatz zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im *in vivo* Modell bestätigt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass transplantierte CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC im Vergleich zu CD 34+ / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC vermehrt an Orte vaskulärer Läsionen rekrutiert werden. Zusätzlich zeigten sie eine vermehrte Reendothelialisierung durch Differenzierung in Endothelzellen sowie eine Verminderung von Läsionsgrößen. Abschließend weisen die oben dargelegten Daten auf ein erhöhtes vasoregeneratives Potential von CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC hin.

Hieraus ergeben sich möglicherweise neue Ansätze zur zell-basierten Therapie mit EPC für die Regeneration von Gefäßen und Geweben nach Ischämie oder Läsion bei einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen. In klinischen Studien konnten bereits viel versprechende Ergebnisse nach Transplantation von aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen gezeigt werden (REPAIR-AMI, TOPCARE-AMI, TOPCARE-CHD). Dabei wurden Patienten nach Myokardinfarkt aus dem Knochenmark stammende oder zirkulierende Progenitorzellen transplantiert. Diese Patienten zeigten eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (Assmus et al. 2006; Schächinger et al. 2006). In Zukunft könnte möglicherweise die Transplantation selektiver hoch regenerativer EPC Populationen wie die in dieser Arbeit beschriebene CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ Subpopulation einen höheren therapeutischen Gewinn bringen.

## 6.5. Fazit dieser Arbeit

Die in dieser Studie erhobenen Daten konnten eine neue CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC Subpopulation identifizieren und weisen darauf hin, dass CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC eine Schlüsselrolle innerhalb der endothelialen Regeneration übernehmen. Durch gezielte therapeutische Nutzung der EPC könnte die physiologische Regenerationskapazität des Gefäßsystems gesteigert werden. Dies würde neue Therapiemöglichkeiten der Atherosklerose eröffnen. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten konnten zeigen, dass erhöhte kardiovaskuläre Risikofaktoren und vermehrte endotheliale Dysfunktion mit verminderten EPC Spiegel korrelieren (Hill et al. 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Anzahl zirkulierender EPC prognostisch mit dem Risiko kardiovaskulärer Ereignisse und Tod nach kardiovaskulären Ereignissen zusammenhängt (Werner et al. 2005). Eine gezielte Steigerung von EPC Spiegel könnte zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion und der atherosklerotischen Beschwerden führen.

Eine therapeutische Erhöhung der EPC Spiegel ließe sich über mehrere Wege erreichen. Einerseits konnte gezeigt werden, dass Erythropoetin (Bahlmann et al. 2004), Östrogene (Strehlow et al. 2003), Statine (Dimmeler et al. 2003), G-CSF (Ince et al. 2007), VEGF (Heisig et al. 2005) sowie körperliche Betätigung (Laufs et al. 2004) zu einer Erhöhung von EPC Spiegel führen. Andererseits kommt die Transplantation von in Kultur aufgereinigten Progenitorzellen zur Erhöhung von EPC Spiegel in Frage. Ein positiver Effekt konnte bereits bezüglich einer verbesserten linksventrikulären Ejektionsfraktion nach Myokardinfarkt in mehreren Studien (REPAIR-AMI, TOPCARE-AMI, TOPCARE-CHD) belegt werden (Assmus et al. 2006; Assmus et al. 2007; Schächinger et al. 2006)

Die zell-basierte Therapie mit EPC ist derzeit jedoch noch mit verschiedenen Risiken behaftet. Der positive Effekt der Angiogenese durch EPC kann innerhalb von Plaques auch zu einer potentiellen Destabilisierung von Plaques beitragen, die in ihrer Konsequenz zur Vergrößerung der Läsion beitragen oder zum akuten Infarkt führen kann (Libby 2002). Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass Neovaskularisation vermittelt über Rezeptoren wie VEGF und CXCR4 auch in der Tumorgenese eine wesentliche Rolle einnimmt (Dewan et al. 2006). Ferner sind proinflammatorische Effekt und immunologische Inkompatibilitäten nach Transplantation zu bedenken. Weitere Studien müssen das Risiko dieser möglichen Komplikationen genauer untersuchen.

Um diese Nachteile zu umgehen, wäre eine selektive und spezifische Aktivierung endogener EPC wünschenswert. Es bestehen jedoch Unklarheiten hinsichtlich der EPC Subpopulation mit der höchsten Effektivität und Selektivität, der geeignetsten Darreichungsform (Infusion einer Zellpopulation oder als Mischkultur) sowie über die beste Form der Applikation (systemisch oder lokal). Für eine therapeutische Transplantation wären CD 34- / CD 133+ / VEGFR-2+ EPC innerhalb der heterogenen Gruppe der EPC eine viel versprechende Zellpopulation, da sie ein besonders hohes vasoregeneratives Potential besitzen. Genauere Studien müssten die effektivste Therapieform und das Risiko möglicher Komplikationen untersuchen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967
2. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221-228
3. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106: 3009-3017
4. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Aboolmali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM (2006) Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction (TOPCARE-CHD). *N Engl J Med* 355: 1222-1232
5. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger HF, Fichtlscherer S, Tonn T, Seifried E, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM (2007) Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res* 100: 1234-1241
6. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D (2004) Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 103: 921-926
7. Bauters C, Isner JM (1997) The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* 40: 107-116



8. Beaglehole R, Irwin A, Prentice T, Bonita R, Reddy S (2003) The world health report 2003: Shaping the future. World health organization 2003: chapter six
9. Blau HM, Brazelton TR, Weinmann JM (2001) The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105: 829-841
10. Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, De Mol M, Bouch A, van den Oord JJ, Kockx M, Collen D (1997) Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Pathol* 150: 761-776
11. Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N (2006) Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 60: 273-276
12. Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N, Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds) (2002) *Harrisons Innere Medizin* 2. 15. Aufl. Berlin-Leiben
13. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rhim C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM (2003) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitors cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 665-670
14. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95: 3106-3112
15. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S (2001) Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2<sup>+</sup> AC 133<sup>+</sup> endothelial precursor cells. *Circ Res* 88: 167-174
16. Gimbrone Ma Jr (1999) Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis, *Am J Pathol* 155(1): 1-5

17. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S (2003) Biology and plasticity of CD 133+ hematopoietic stem cells. *Ann N/Y Acad Sci* 996: 141-151
18. Heisig B, Rafii S, Akiyama H, Ohki Y, Sato Y, Rafael T, Zhu Z, Hicklin DJ, Okumura K, Ogawa H, Werb Z, Hattori K (2005) Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. *J Exp Med* 202: 739-750
19. Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A, Egashira K. (2004) Gene transfer of stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway. *Circulation* 109: 2454-2461
20. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348: 593-600
21. Ince H, Nienaber CA (2007) Granulocyte-colony-stimulating factor in acute myocardial infarction: future perspectives after FISRTLINe-AMI and REVIVAL-2. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 4: 114-118
22. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T (2000) Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3422-3427
23. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T (2003) Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 107: 461-468

24. Kinlay S, Libby P, Ganz P (2001) Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 12: 383-389
25. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7: 430-436
26. Kuci S, Wessels JT, Bühring HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, Löffler J, Bader P, Schlegel PG, Niethammer D, Handgretinger R. Identification of a novel class of human adherent CD 34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells (2003) *Blood* 101: 869-876
27. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Mische E, Böhm M, Nickenig G (2004) Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109: 220-226
28. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK (1992) A cascade model for restenosis: a special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 86 (suppl III): III-47-III-52
29. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK (1997) Molecular biology of atherosclerosis. *Int J Cardiol* 62 (suppl 2): 23-29
30. Libby P (2000) Changing concepts of atherogenesis. *J Int Med* 247: 349-358
31. Libby P, Aikawa M, Kinlay S, Selwyn A, Ganz P (2000) Lipid lowering improves endothelial functions. *Int J Cardiol* 74: 3-10
32. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874
33. Libby P, Theroux P (2005) Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111: 3481-3488

34. Libby P (2006) Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 83 (suppl): 456S-460S
35. Lithell H (1994) Pathogenesis and prevalence of atherosclerosis in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 7 (7 Pt 2): 2S-6S
36. Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241
37. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC (2005) Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation* 110: 1868-1873
38. Nakajima H (1997) The world health report 1997: conquering suffering, enriching humanity. World health organization 1997: 40-44
39. Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, Hotta T, Kato S (1999) Ex vivo generation of CD 34+ cells from CD 34- hematopoietic cells. *Blood* 94: 4053-4059
40. Nowak G, Karrar A, Holmén C, Nava S, Uzunel M, Hulténby K, Sumitran-Holgersson S (2004) Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. *Circulation* 110: 3699-3707
41. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 401: 701-705
42. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95: 952-958
43. Rafi S, Lyden D (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9: 702-712

44. Ross R (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126
45. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI). *N Engl J Med* 355: 1210-1221
46. Schwartz SM (1997) Perspectives series: cell adhesion in vascular biology: smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 99: 2814-2816
47. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore Ma, Storb RF, Hammond WP (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92: 362-367
48. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katho A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T (2001) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103: 2776-2779
49. Shmelkov SV, St.Clair R, Lyden D, Rafii S (2005) AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 715-719
50. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *The Lancet* 361: 45-46
51. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106: 1913-1918

52. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G (2003) Estrogen increases bone marrow derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 107: 3059-3065
53. Urbich C, Dimmeler S (2004) Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95: 343-353
54. Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rockwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdedos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S (2005) Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res* 97: 1142-1151
55. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G (2002) Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1567-1572
56. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G (2003) Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 93: e17-e24
57. Werner N, Kosiol S, Schiegel T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353: 999-1007
58. Werner N, Nickenig G (2006) Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 10: 318-332
59. Yang C, Zhang ZH, Li ZJ, Yang RC, Qian GQ, Han ZC (2004) Enhancement of neovascularization with cord blood CD 133+ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation. *Thromb Haemost* 91: 1202-1212

## **8. Dank**

Ich danke Herrn Professor Dr. med. G. Nickenig für das Vertrauen bei der Überlassung des Themas und seine wissenschaftliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Böhm für die Möglichkeit, diese Dissertation im Labor der Klinik für Innere Medizin III der Universitätsklinik des Saarlandes Homburg/Saar erstellen zu können. Insbesondere bedanke ich mich für sein Vertrauen und seine persönliche Förderung und Unterstützung diese Arbeit zu einem größt möglichen Erfolg zu führen.

Zu tiefer Dankbarkeit verpflichtet bin ich meinem Betreuer Dr. med. Erik B. Friedrich. Ich danke für die hervorragende Betreuung, fachlich sowie menschlich, das außergewöhnliche Engagement und die Fähigkeit Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten zu wecken. Es ist ein ausgesprochenes Privileg mit ihm zusammengearbeitet haben zu dürfen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei den MTA´s Bianca Klöckner, Simone Jäger und Sybille Richter für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und ihre unerschöpfliche Geduld.

Dr. med. Nikos Werner danke ich für die Durchführung der Carotis externa Läsionen.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der kardiologischen Forschung für die freundliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Abschließend danke ich meiner lieben Freundin Julia Knüppel, die in mühevoller Arbeit diese Dissertation wieder und wieder korrigieren musste.

## **9. Vorabveröffentlichungen**

### **8.1. Originalarbeiten**

Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N (2006) CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. Circ Res 98(3): e20-25

### **8.2. Veröffentlichte wissenschaftliche Beiträge zu nationalen und internationalen Tagungen (Abstracts):**

Friedrich EB, Walenta K, Werner N, Scharlau J, Nickenig G (2005) A primitive CD34-/133+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. Circulation 112 (Suppl 17): II-43



## 10. Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name, Vorname:	Scharlau, John Benjamin
Geburtsdatum:	02.09.1979
Geburtsort:	Hamburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Dr. Winfried Scharlau, Journalist Christiane Scharlau, geb. Pickert, Photographin
Geschwister:	eine Schwester
Familienstand:	ledig

### **Schulausbildung:**

1985 – 1987	Deutsche Schule Singapur
1987 – 1989	Grundschule Schulkamp Hamburg
1989 – 1991	Gymnasium Hochrad Hamburg
1991 – 1992	Deutsche Schule Washington D.C.
1992 – 1995	Gymnasium Hochrad Hamburg
1995 – 1996	Millbrook School, N.Y.
1996 – 1999	Gymnasium Hochrad
25.6.1999	Abitur

### **Staatsdienst:**

1999 – 2000	Zivildienst Kinderhaus Heinrichstrasse Hamburg
-------------	--

**Studium:**

seit Okt. 2000	Student der Medizin an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar
6.9.2002	Ärztliche Vorprüfung
6.9.2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30.3.2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
24.4.2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Promotion:**

1.10.2003	Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit an der Universität des Saarlandes bei  Professor Dr. M. Böhm Klinik für Innere Medizin III (Direktor Professor Dr. M. Böhm)
6.7.2007	Calogero-Pagliarello-Preis für besondere Leistungen

Homburg, den 29. Juni 2007